Aus dem Institut für Experimentelle Therapie und
Funktionelle Pathologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. phil. Dr. med. vet. Dr. med. G. Schützler

---

Die Anwendung der Farbstoffe Amidoschwarz 10 B, Ponceau S und Procion Brillant Blau M-RS für die quantitative Agarose-Gelelektrophorese

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt
von
Christine Pulvermacher
Tierärztin aus Seefeld/Tirol
Berlin 1970
Journal-Nr.: 696

Aus dem Institut für Experimentelle Therapie und
Funktionelle Pathologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. phil. Dr. med. vet. Dr. med. G. Schützler

---

Die Anwendung der Farbstoffe Amidoschwarz 10 B, Ponceau S und Procion Brillant Blau M-RS für die quantitative Agarose-Gelelektrophorese

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt
von
Christine Pulvermacher
Tierärztin aus Seefeld/Tirol
Berlin 1970
Journal-Nr.: 696

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. K. Bronsch

Referent: Prof. Dr. Dr. Dr. G. Schützler

Korreferent: Prof. Dr. K. Drepper

Tag der Promotion: 11. Februar 1970

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung..... 3

II. Literaturübersicht

1. Elektrophorese..... 4
2. Mechanismen der Farbstoffbindung..... 14

III. Eigene Untersuchungen

1. Herstellung der Gelplatten..... 17
2. Serumgewinnung..... 17
3. Ermittlung des Albumin- und Globulingehaltes..... 17
4. Herstellung der Verdünnungsreihen..... 18
5. Serumauftragung..... 18
6. Agarose-Gelelektrophorese..... 19
7. Fixation und Wässern..... 19
8. Färbung..... 20
9. Densitometrische Auswertung..... 20
10. Freie Elektrophorese..... 21

IV. Ergebnisse..... 23

V. Diskussion..... 28

VI. Zusammenfassung..... 33

VI. Summary 34

VII. Literaturverzeichnis..... 35

VIII. Abbildungen

Abb. 1 Absorptionsspektrum der an Eiweiß gebundenen Farbstoffe... 45

Abb. 2-19 Albumin- und Globulinregressionsgeraden für den Farbstoffvergleich..... 46

Abb. 20 Albumin- und Globulinregressionsgeraden für die Farbstoffaffinität..... 64

IX. Tabellen

Seite

Tab. 1 Albumin-/Globulin-Bestimmung nach KACHANI/RODKEY..... 66

Tab. 2 Darstellung des Analysenmaterials für einen Hund..... 67

Tab. 3 Vergleich der mittleren Farbstoffaufnahme von Amidoschwarz 10 B, Ponceau S, Procion Brillant Blau M-RS durch Albumin bzw. Globulin.. 68

Tab. 4 Vergleich der mit den Methoden Freie Elektrophorese - Agarose-Gelelektrophorese erhaltenen Werte 69

I. Einleitung

Es ist bisher nicht gelungen, die Unterschiede in der Farbstoffaffinität von Eiweißfraktionen gesunder und pathologischer Seren mit Hilfe der Papier- und Celluloseacetatelektrophorese zu klären.
In Betracht gezogen wird die Möglichkeit, daß uneinheitliche Farbstoffe das quantitative Elektrophoreseergebnis verfälschen können.

In der vorliegenden Arbeit wird die Sicherheit der quantitativen Elektrophorese auf Agarose-Gel unter Verwendung moderner Auswertungsgeräte geprüft.
Es wird der Einfluß verschiedener Farbstoffe auf das Elektrophoreseergebnis unter Einsatz von nativem Serum untersucht.
Weiterhin wird ein Weg zur Prüfung der Farbstoffaffinität am nativen Serum aufgezeigt.
Mit der hier vorgeschlagenen Methode werden die Seren von 47 gesunden Schäferhunden auf ihr Albumin-/Globulin-Verhältnis untersucht.

II. Literaturübersicht

1. Elektrophorese

Seit der Entwicklung der Papierelektrophorese durch CREMER und TISELIUS (4), TURBA und ENENKEL (51), GRASSMANN und HANNIG (16), der Celluloseacetatelektrophorese durch KOHN (25), FRIEDMAN (12), GRAHAM und GRUNBAUM (15) und der Agargelelektrophorese durch GORDON et al. (13), GRABAR und WILLIAMS (14) wurde eine große Zahl von Arbeiten über die Methoden der Trägerelektrophorese veröffentlicht.

Diese Elektrophoreseverfahren fanden schnell Eingang in das klinische Laboratorium und erlangten als wichtige diagnostische Methoden Bedeutung. Die außerordentlich vielfältigen Fehlerquellen gaben Anlaß zu weiteren klärenden Untersuchungen. In zahlreichen Laboratorien wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, deren Ergebnisse zwar für den einzelnen Untersucher, soweit die Elektrophoresemethode stets nach dem gleichen Schema durchgeführt wurde, von diagnostischer Bedeutung waren, sich jedoch nicht ohne weiteres auf die Ergebnisse anderer Laboratorien übertragen ließen. Dieses ist besonders dann der Fall, wenn es sich um quantitative Aussagen handelt.

Die Mehrzahl der Veröffentlichungen liegt über das zuerst entwickelte Elektrophoreseverfahren, die Papierelektrophorese vor. Als Fehlerquellen bzw. Ursachen für die voneinander abweichenden Ergebnisse werden diskutiert:

1) Adsorption der meisten Proteine und Proteide an die Papierfaser

2) Unvollkommene Denaturierung der Proteine

3) Zu hohe Proteindichte auf dem Träger

4) Anwendung verunreinigter Farbstoffe

5) Unterschiedliche Farbstoffaffinitäten der Proteine

6) Durch Nichteinhalten bestimmter Färbe- und Entfärbezeiten bedingte Fehler

7) Erschwerung der densitometrischen Auswertung durch unvollkommene Transparenz des Trägers

Da alle diese Fehlerquellen mit Ausnahme von Punkt 1) und Punkt 7) für jede Art der Trägerelektrophorese, also auch für die Elektrophorese auf Agarose-Gel von Bedeutung sind, wird eine kurze Einführung in einige, die Papierelektrophorese betreffende Veröffentlichungen gegeben.
Auf den durch die Adsorption der meisten Proteine und Proteide an den Träger bedingten Unsicherheitsfaktor weist eine Reihe von Autoren hin:
PEZOLD (36), SLATER und KUNKEL (46), JENCKS et al.(23), OSBORN (32).
Nach JENCKS et al.(23) beeinflußt die Denaturierungszeit die Farbstoffaufnahme von Humanalbumin. Eine ausreichende Denaturierung wird erst erreicht, wenn der Papierelektrophoresestreifen 30 Minuten einer Temperatur von 110 bis 120 °C ausgesetzt wird. Die Autoren zeigen, daß sich bei der Auswertung von Pherogrammen, die nicht denaturiert, sondern nur bei Zimmertemperatur getrocknet wurden, im Vergleich zu den hitzedenaturierten Pherogrammen Abweichungen ergeben.
OSBORN (32), HENRY et al. (19) weisen darauf hin, daß voneinander abweichende Grade der Reaktivität der Farbbindungsgrößen gefunden werden, wenn unterschiedliche Denaturierungsagentia angewendet werden. Überdies können Substanzen, wie z.B. die Sulfosalicylsäure, die sich mit dem Proteinmolekül verbinden, die Farbstoffbindung beeinflussen.

Nach OSBORN (32) besteht die Gefahr eines Proteinverlustes beim Eintauchen der Papierelektrophoresestreifen in das Denaturierungsbad. Er schlägt vor, die Streifen vor dem Eintauchen in das Bad einzufrieren.

Einen wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis der Papierelektrophorese übt nach HEIDE und BIEL (17) die auf dem Elektrophoresestreifen vorhandene Eiweißdichte aus. Eine lineare Anfärbung erfolgt bei Färbung mit Amidoschwarz nach diesen Autoren bis zu einer Dichte von 0,6 γ/mm^2. SIMON (45) gibt unter Anwendung des gleichen Farbstoffes einen Wert von 0,1 γ/mm^2 an. Bei Färbung mit Lichtgrün stellt OSBORN (32) eine kritische Proteindichte von 2 γ/mm^2 fest.
Eine Nichtlinearität der Eichkurven, die nicht durch zu hohe Proteindichte auf dem Träger bedingt ist, stellen LATNER und PARK (27) bei ihren Untersuchungen über die quantitative Papierelektrophorese unter Anwendung des Farbstoffes Lissamingrün fest. Die Farbstofflösung enthielt 3 %ige Sulfosalicylsäure. Die Auswertung wurde durch Reflexionsdensitometrie vorgenommen.
SUNDERMAN und SUNDERMAN (47) stellten unter Anwendung von Amidoschwarz und Bromphenolblau Eichkurven von Albumin, α-, ß- und γ-Globulin auf. Sie weisen darauf hin, daß die von ihnen mit Hilfe der Photometrie ermittelten Abweichungen im unteren Eichkurvenbereich zu Fehlern bei der Ermittlung der Proteine führen, die wie das α- Globulin in niedriger Konzentration vorliegen. Abweichungen vom LAMBERT-BEERschen Gesetz stellte auch OSBORN (32) für Albumin und γ-Globulin unter Anwendung der Farbstoffe Lichtgrün, Lissamingrün und Bromkresolgrün mit Hilfe der Elutionstechnik fest. Der Autor hält es für wahrscheinlich, daß die Abweichungen der Eichkurven im unteren

Konzentrationsbereich auf die Interferenz von Anionen zurückzuführen sind.
Den Ergebnissen der Autoren, die ein Abweichen vom stöchiometrischen Verhalten der Eichkurven feststellen, steht eine große Zahl von Autoren gegenüber, die eine strenge Linearität zwischen dem gemessenen Farbstoff und der Eiweißdichte mit Hilfe der Elution oder der Densitometrie ermitteln.
PEZOLD und PEISER (37), MACKAY et al. (29), HENRY et al.(19), JENCKS et al.(23) weisen jedoch darauf hin, daß sich bei Anwendung der Densitometrie im Albuminbereich Abweichungen ergeben, die eine Korrektur erforderlich machen.

In Untersuchungen über das Farbstoffbindungsvermögen von Albumin und γ-Globulin gegenüber den Farbstoffen Amidoschwarz, Azokarmin und Bromphenolblau stellten PEZOLD und PEISER (37) fest, daß die Eichkurven zwar einen linearen Verlauf zeigen, jedoch weist das Farbstoffbindungsvermögen von Albumin und Globulin von jedem Farbstoff eine unterschiedliche Größe auf. Die Differenz in dem Farbstoffbindungsvermögen der beiden Fraktionen ist bei Azokarmin am größten, bei Amidoschwarz geringer und beim Bromphenolblau unbedeutend.
SCARDI und BONAVITA (43) dagegen fanden bei der Prüfung der gleichen Serumfraktionen auf ihr Farbstoffbindungsvermögen gegenüber diesen Farbstoffen, daß bei der Anwendung von Azokarmin die Eichkurven einen linearen Verlauf zeigen. Für Amidoschwarz und Bromphenolblau bestehen keine stöchiometrischen Beziehungen zwischen Farbstoff und Protein, die Differenzen in der Farbstoffaufnahme der beiden Proteine verhalten sich nicht proportional der Konzentration.
Zu anderen Ergebnissen kamen GRASSMANN und HANNIG(16). Sie prüften die Farbstoffaffinität von Albumin, α- und γ-Globulin gegenüber den Farbstoffen

Amidoschwarz, Azokarmin und Bromphenolblau und fanden, daß die quantitative Auswertung in Abhängigkeit vom Farbstoff zu unterschiedlichen Ergebnissen führt.
Nach diesen Autoren ist Amidoschwarz sowohl wegen der höheren Extinktionswerte wie auch wegen der erheblich besseren Übereinstimmung in der Anfärbung der drei geprüften Proteinfraktionen eindeutig vorzuziehen. Nebenkomponenten von Amidoschwarz, die in dem von einigen Herstellern angebotenen Farbstoff enthalten sind, können nach DITTMER und TLACH (7) auf die Auswertungsergebnisse Einfluß nehmen. Die Autoren folgern aus ihren Untersuchungen, daß verunreinigte Amidoschwarzchargen für elektrophoretische Zwecke nur bedingt verwendbar sind, da sie im klinischen Routinegebrauch nicht nur die methodischen Fehlerbreiten unnötig vergrößern, sondern darüber hinaus die elektrophoretischen Meßergebnisse unkontrollierten Einflüssen aussetzen.

Über die Farbstoffaffinitäten der einzelnen Serumproteine liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Die verschiedenen Serumfraktionen zeigen bei Anwendung eines Farbstoffes erhebliche Differenzen im Farbstoffbindungsvermögen, und diese Differenzen sind - wie oben dargelegt - in Abhängigkeit von dem angewendeten Farbstoff verschieden groß.
Die Angaben verschiedener Autoren über die mit einem Farbstoff ermittelten Anfärbbarkeitsfaktoren schwanken erheblich. Eine Zusammenstellung findet sich bei SUNDERMAN und SUNDERMAN (47).
Bei Anwendung von Amidoschwarz wurden mit den Methoden der Densitometrie oder der Elution unter einem Bezugswert von Albumin gleich 100 folgende Werte gefunden: α-Globulin 72-91, ß-Globulin 65-83, γ-Globulin 64-98. Bei der Färbung mit Bromphenolblau erhielten die verschiedenen Autoren Ergebnisse, die ebenfalls

starke Abweichungen aufweisen: α -Globulin 53-69, ß-Globulin 53-64, γ -Globulin 57-92.

Auf die Wahrscheinlichkeit, daß die Fraktionen pathologischer Seren eine veränderte Farbstoffaffinität zeigen, weisen PEZOLD (36), JENCKS et al. (23), OTT et al.(33) hin. Im Hinblick darauf erscheint es PEZOLD in Übereinstimmung mit anderen Autoren (s.WUNDERLY (58)) nicht zweckmäßig, Korrekturfaktoren anzuwenden. PEZOLD (36) hält auch die Anwendung von Korrekturfaktoren bei Normalseren für nicht angebracht. Seiner Ansicht nach stellen die angegebenen Faktoren willkürliche Größen dar, da die von den einzelnen Arbeitsgruppen angegebenen Werte stark voneinander abweichen.

JENCKS et al.(23) betonen, daß die Denaturierungs-, Färbe- und Waschzeiten genau eingehalten werden müssen, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. OSBORN (32) untersuchte den Einfluß der Temperatur auf den Waschprozeß und fand, daß mit steigender Temperatur bis zu 35 °C ein anwachsender Anteil von Farbstoff aus dem gefärbten Elektrophoresestreifen entfernt wird.

Der Arbeitskreis um DURRUM stellte fest, daß bei der densitometrischen Messung das Licht nicht gleichmäßig durch die gefärbten Papierstreifen tritt (JENCKS et al. (23)). Nach GRASSMANN und HANNIG (16) trifft jedoch die Voraussetzung für eine densitometrische Messung, eine Schwächung des Lichtes ausschließlich durch Adsorption an die gefärbten Proteine für den transparent gemachten Streifen annähernd zu.
Auf die Notwendigkeit, die Papierelektrophorese unter standardisierten Bedingungen vorzunehmen, weisen SUNDERMAN und SUNDERMAN (47), OSBORN (32), HENRY et al. (19), JENCKS et al.(23) hin. OSBORN erklärt

am Schluß seiner Ausführungen, daß man dem Verfahren der Papierelektrophorese skeptisch gegenüber stehen sollte.

Die von KOHN (25) entwickelte Methode der Celluloseacetatelektrophorese stellt gegenüber der Papierelektrophorese einen Fortschritt dar, da sowohl die störende Adsorption fehlt als auch der Träger nach Behandlung mit einem Gemisch aus Dioxan und Isobutanol nicht wie Papier Streulichteffekte zeigt, sondern vollkommen klar und lichtdurchlässig ist.

Die von verschiedenen Autoren ermittelten methodischen Fehler der Celluloseacetatelektrophorese schwanken stark. In der Tabelle sind die Angaben einiger Autoren verzeichnet:

Friedman(12) Hum.Serum Amidoschw.	Sammons(42) Whitehead Hum.Serum Lissamingr.	Rice(39) Bleakney Hum.Serum Nigrosin	Hennemann(18) Hundeserum Amidoschwarz	
+	0	+	+	
7,2	7,0	5,6	12,0	Albumin
26,0	20,0	6,7		α-Glob.
23,0		6,5	18,0	β-Glob.
30,3		6,5		γ-Glob.

Methodischer Fehler in v%
+ Densitometrie; 0 Elution

Vorschläge zur Standardisierung elektrophoretischer Trennverfahren auf Celluloseacetat machen PERL und VOGGEL (34).
Bei den von RICE und BLEAKNEY (39) dargestellten Eichkurven fällt auf, daß sie außerordentlich stark vom Koordinatenanfangspunkt abweichen und die Ordinate, auf der die Integrationseinheiten aufgetragen sind, in unterschiedlichen Punkten schneiden.
Im Hinblick auf die Differenz in dem Farbbindungs-

vermögen vom Albumin und den Globulinen erscheint es WEBSTER (55) zweckmäßig, den Albumingehalt mit Hilfe eines Vergleichsstandards zu ermitteln. Bei dem von ihm angegebenen Verfahren wird zunächst auf dem Celluloseacetatstreifen die Elektrophorese mit zwei Proben des Testserums, dessen Proteingehalt nach WEICHSELBAUM (56) ermittelt wurde, durchgeführt, sodann zwei definierte Mengen eines Humanreinalbumins mit bekanntem Eiweißgehalt auf freie Stellen des Streifens aufgetragen, die Proteine fixiert, gefärbt, entfärbt und der Träger getrocknet. Die Ermittlung des Albumingehaltes erfolgt nach der getrennten Elution des Standards und der Fraktionen aufgrund folgender Formel:

$$\text{Serumalb. g/100 ml} = \frac{\text{mittlere opt.Dichte Serumalb.}}{\text{mittl.opt.Dichte d.4\%HSA-Stand.}} \times 4$$

Das Globulin ergibt sich aus der Differenz zwischen dem Gesamtprotein und Albumin. Einzelne Globulinfraktionen werden nach folgender Formel ermittelt:

$$\alpha_1\text{-Globulin} = \frac{\text{Opt. Dichte } \alpha_1}{\text{Opt. Dichte}(\alpha_1+\alpha_2+\beta+\gamma)} \times \begin{matrix}\text{Gesamtglobulin} \\ \text{in g\%}\end{matrix}$$

Der Autor führt die Differenzen in der Relation Farbstoff zu Proteinmengen zwischen Albumin und Globulin zum Teil auf die ungleiche Untergrundfärbung zurück. Im Hinblick auf die Variabilität der von verschiedenen Autoren für die Globulinfraktionen angegebenen Korrekturfaktoren hält WEBSTER (55) es für unzweckmäßig, solche Faktoren anzuwenden.

Nach Untersuchungen von HENNEMANN (18) ist es bei der Celluloseacetatelektrophorese außerordentlich schwierig, definierte Proteinmengen an der Startstelle gleichmäßig aufzutragen.
FRIEDMAN (12) diskutiert über die Zweckmäßigkeit der Anwendung von Korrekturfaktoren und weist darauf hin,

daß es notwendig sei, dieses Thema erneut zu bearbeiten. BUSSE und DULCE (3) prüfen die Farbstoffaffinität von Reinfraktionen auf Celluloseacetat nach den von SCARDI und BONAVITA (43), DITTMER (6), OSBORN (32) für den Träger Papier angegebenen Verfahren. Hierbei werden definierte Proteinmengen in verschiedenen Konzentrationen auf den Träger aufgetragen, fixiert, eluiert, gemessen und Eichkurven aufgestellt.
BUSSE und DULCE (3) färben die auf der Celluloseacetatfolie verteilten Proteine mit Amidoschwarz 10 B, Neucoccin und Ponceau S. Sie geben an, daß uneinheitliche Farbstoffe (Amidoschwarz 10 B, Neucoccin) nicht linear-proportional an alle Proteinfraktionen gebunden werden. Nach diesen Autoren ist eine einwandfreie Reproduzierbarkeit des Verfahrens erst dann gewährleistet, wenn einheitliche, reine Farbstoffe angewendet und die gemessenen Extinktionswerte entsprechend dem unterschiedlichen Farbstoffbindungsvermögen mit den von den Autoren angegebenen Faktoren korrigiert werden.

Auf den Träger Agar können im Gegensatz zur Celluloseacetatfolie definierte Proteinvolumina auf die Startstelle völlig gleichmäßig aufgetragen werden. Der Träger ist optisch leer, die Elektrophorese auf dem Agargel nach der Methodik von WIEME nähert sich den idealen Bedingungen, wie sie für die Freie Elektrophorese gegeben sind.(WIEME (57)) Nach diesem Autor ist eine genaue quantitative Bestimmung wegen der Konglomeratbildung im Albuminbereich und der im Agar enthaltenen Sulfatgruppen nicht möglich (WIEME (57), JANSEN (21), KREUTZER (26)). Die Autoren schlagen für quantitative Untersuchungen vor, anstelle von Agar die besonders gereinigte Agarose zu verwenden. Ein Hindernis für die quantitativen Untersuchungen auf Agargel ist nach VREEDENDAAL (54) die ungenügende

Fixierung der Proteine durch die von den einzelnen Autoren angewendeten Fixationsmittel. Nach diesem Autor gewährleistet nur ein Formaldehyd-Trichloressigsäuregemisch eine ausreichende Fixierung. Nach DAVIDSEN (5) eignet sich als Fixationsmittel für die Proteine im Agarose-Gel nur ein Pikrin-Essigsäuregemisch. Der Autor weist nach, daß bei Verwendung der üblichen Fixationsmittel Proteine aus dem Agarose-Gel in das zum Pufferentzug eingesetzte Filterpapier übertreten. Diese Ergebnisse decken sich mit noch nicht veröffentlichten Untersuchungen dieses Institutes.
RIEDER und NUSSELT (40) setzen das von WIEME (57) angegebene Verfahren unter Zusatz von 5-25 % Agarose zum Agar ein. Sie führen die Auswertung der Pherogramme zur Erfassung der intensiv gefärbten Albuminfraktion in mehrmaligen aufeinanderfolgenden Messungen mit dem Vitatron-Photometer im Extinktionsbereich 0 - 1, 1 - 2 und 2 - 3 durch. Die mit diesem Verfahren nicht erfaßten über der Extinktion 3 liegenden Werte werden durch ein von ihnen genanntes Extrapolationsverfahren ermittelt. Diese Autoren geben in Übereinstimmung mit WIEME (57) an, daß die Ermittlung der von der Messung nicht erfaßten Albuminanteile mit Hilfe der von URIEL (52) angegebenen komplizierten Meß- und Rechenoperationen praktisch nicht durchführbar ist.

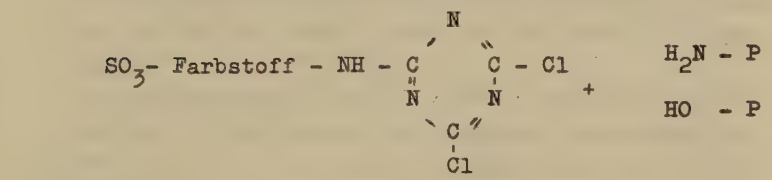
Zur quantitativen Bestimmung der Serumproteine eignet sich nach den Erfahrungen von SIEGERT, SCHÜTZLER und JAROFKE (44) das von diesen Autoren angegebene Verfahren. Hierbei erfolgt die Ermittlung des Albumins unter Einsatz des 1 : 5 verdünnten Serums und des Globulins aus unverdünntem Serum auf Agarose-Gel. Zur Fixation wird 5 %ige alkoholische Essigsäure verwendet, die Puffersalze werden durch 17-stündiges Wässern entzogen. Proteinverluste konnten bei diesem Verfahren nicht beobachtet werden.

2. Mechanismen der Farbstoffbindung

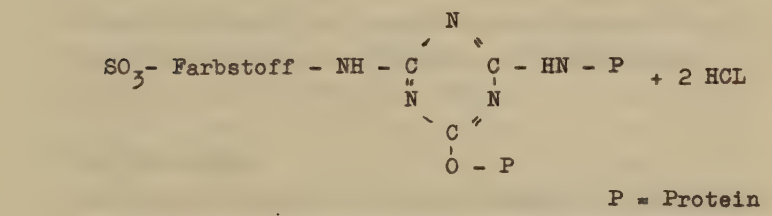
Die Farbstoffe Amidoschwarz 10 B (ZOLLINGER (59), WIEME (57), DITTMER (6), FAZEKAS et al.(10) und BUSSE (2)), Ponceau S (BUSSE (2), DOWDING und TARNOKY (8) und DITTMER (6)) und Procion Brillant Blau M-RS (ZOLLINGER (59), REINERT (38), VICKERSTAFF (53), SCHWENKE und GEYER (50) und FAZEKAS et al. (10)) haben für die Färbung von elektrophoretisch getrennten Serumproteinen Bedeutung erlangt. Während nach WIEME (57) Amidoschwarz 10 B (C.I. 20470, E.Merck, Darmstadt) ein geeigneter Farbstoff ist, empfehlen BUSSE (2) Ponceau S (C.I. 27195, Serva-Laboratorium, Heidelberg), FAZEKAS et al.(10) Procion Brillant Blau M-RS (Serva-Laboratorium, Heidelberg), das wegen seiner guten Reproduzierbarkeit und Beständigkeit der Proteinbindung Bedeutung erlangt hat, als Farbstoffe der Wahl.

Nach SIMON (45), LEWIN und HILLION (28) erfolgt die Färbung bei den Azofarbstoffen Amidoschwarz und Ponceau S durch Bindung von Sulfongruppen (Amidoschwarz ist eine Disulfonsäure, Ponceau S eine Tetrasulfonsäure) der Farbstoffe an basische Reste des Eiweißmoleküls. Die Färbung wird unterhalb des isoelektrischen Punktes der beteiligten Eiweiße (4,8 Albumin bis 7,3 γ-Globulin) im sauren Milieu vorgenommen. Die Proteine liegen hier als Kationen vor.
Neben der eigentlichen Salzbildung zwischen den Farbionen und dem Substrat spielen zwischenmolekulare Kräfte, wie Wasserstoffbrücken, Van der Waalsche Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen eine Rolle (HOPFF (20), ZOLLINGER (59), PEZOLD und PEISER (37)).

Wie VICKERSTAFF (53), SCHWENKE und GEYER (50), REINERT (38) und FAZEKAS et al.(10) beschreiben, wird bei den Reaktivfarbstoffen zwischen Farbstoff und dem zu färbenden Material eine chemische Bindung hergestellt.
Reaktivfarbstoffe bestehen aus einer chromophoren und einer reaktiven Komponente. Die reaktiven Gruppen des Farbstoffes gehen mit dem Substrat eine kovalente Bindung ein, durch die der eigentliche Farbstoff fixiert wird.
ProcionBrillant Blau ist als Dichlortriazinderivat mit zwei beweglichen Chloratomen von relativ hoher Reaktionsfähigkeit. (VICKERSTAFF (53))



Die Bindung der Procionfarbstoffe erfolgt durch Azylierung.



Nach FAZEKAS et al. (10), HOPFF (20), REINERT (38), VICKERSTAFF(53) steigt mit zunehmendem p_H die Hydrolyse des Farbstoffes. Daher kommen FAZEKAS et al.(10) zu dem Schluß, mit frisch zubereiteten, sauren Lösungen zu färben, wobei es auch zu einer kovalenten, nahezu irreversiblen Bindung durch Reaktion mit Hydroxyl-, Amino- und Peptidgruppen der Proteine kommen soll.

Im Gegensatz dazu sagen VICKERSTAFF (53), HOPFF(20), REINERT (38) und SCHWENKE und GEYER (50), daß im alkalischen Milieu die Voraussetzung für das Entstehen einer kovalenten Bindung optimal sei und daß sich im sauren Milieu Reaktivfarbstoffe wie saure Farbstoffe verhalten können, da sich an ihrer chromophoren Gruppe Sulfonsäurereste befinden.

III. Eigene Untersuchungen

1. Herstellung der Gelplatten

Zur Gelherstellung wurden 9 g Agarose (Serva-Entwicklungslaboratorium, Heidelberg) und 100 mg Thiomersal -zur Hemmung des Bakterienwachstums- zu 1000 ml 1 : 1 verd. Veronalpuffer (s.Seite 19) in einen Kolben gegeben.
Der Veronalpuffer wird durch eine Glasfritte filtriert und im Wasserbad auf 80 - 90 °C erhitzt. Mit einem vorher zurückgehaltenen Teil des Puffers wird die Agarose aufgeschwemmt, Thiomersal in Lösung gebracht und beides dann in den heißen Puffer gegeben. Die Mischung wird für 30 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend auf 50 bis 60 °C abgekühlt.
Zur Herstellung der für die Elektrophorese erforderlichen 1,5 mm starken gleichmäßigen Gelschicht auf den 26 x 76 x 1 mm großen Objektträger wird das von WIEME (57) beschriebene Verfahren angewendet. Mit der gleichen Agaroselösung werden die Tröge der Elektrophoresekammer in der bei WIEME genannten Weise beschickt. Die Kammern können mehrere Wochen verwendet werden, die Platten zur Elektrophorese sollen nur 2 - 7 Tage alt sein.

2. Serumgewinnung

Das aus der V.jugularis bzw. V.cephalica antebrachii entnommene Blut von 6 gesunden Beagles wurde bei 3500 U/min. 20 Minuten lang zentrifugiert. Das zur Elektrophorese verwendete Serum wurde bei 4 °C aufbewahrt und war nicht älter als 48 Stunden.

3. Ermittlung des Albumin- und Globulin-Gehaltes

Die Bestimmung des Albumin-/Globulin-Gehaltes wurde nach den Verfahren von KACHANI und RODKEY vorgenommen, und zwar die Ermittlung des Albumin-Gehaltes

nach KACHANI (24) im Überstand, die Ermittlung des Globulin-Gehaltes nach RODKEY (41) im Präzipitat des mit TES Äthanol versetzten Serums in der von HENNEMANN (18) modifizierten Form. Bei dem Farbstoffvergleich wurde der Gesamteiweißwert der untersuchten Seren durch Addition der nach den Verfahren von KACHANI und RODKEY bestimmten Biuretwerte ermittelt. Für die beiden Fraktionen wurden unter Verwendung von Rinderalbumin und Rinder-γ-Globulin (trocken, reinst, Behring-Werke) Eichkurven aufgestellt.

4. Herstellung der Verdünnungsreihen

Bei der Aufstellung von Albuminverdünnungsreihen in 6 Verdünnungsstufen wurden nach Ermittlung des Albumin-Gehaltes aus dem Nativserum die Konzentrationen aufgrund von Erfahrungswerten so aufgestellt, daß bei der densitometrischen Auswertung der Pherogramme die Farbintensität der höchsten Konzentrationsstufe den Extinktionsbereich von 1 nicht überschreitet.

Für das Albumin wurden die Eichkurven in einem Bereich von 8 - 28 % des Normalserums aufgestellt, was einem Albumin-Gehalt von ca. 0,4 g% bis 1,6 g% entspricht.

Zur Aufstellung der Globulin-Eichkurven wurden nach quantitativer Bestimmung dieser Fraktion nach RODKEY (41) aus dem Nativserum Verdünnungsreihen in einem Konzentrationsbereich von 0,7 g% bis 2,2 g% in 7 Verdünnungsstufen hergestellt.

5. Serumauftragung

Zur Herstellung eines gleichmäßigen, stets in derselben Höhe auf dem Träger befindlichen Startschlitzes wurde die bei HENNEMANN (18) beschriebene Apparatur verwendet. In den gestanzten Schlitz wurden 1,6 µl Serum mit einer nach MATTENHEIMER (30) geeichten Mikropipette eingegeben.

6. Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese im Agarose-Gel wurde in der Kammer nach WIEME (57) durchgeführt. Als Spannungsgeber diente der mit einer Membranpumpe kombinierte GVA/CT Spannungsgeber der Firma Vitatron. Beide Apparaturen sind in den Arbeiten von FRICKE (11) und JAROFKE (22) beschrieben. Der zur Füllung der Elektrodenkammern notwendige Veronalpuffer (p_H 8,6, Ionenstärke 0,1) besteht aus

Veronal-Natrium	17	g
0,1 n Salzsäure	235,0	ml
Aqua dest.	ad 1000,0	ml.

Die Trennung erfolgte in 29 Minuten. Sie wurde bei einer konstanten Spannung (215 V) und Petroläthertemperatur (4 °C) durchgeführt. Ein zusätzliches Kühlaggregat bewirkte eine strikte Konstanthaltung der Temperatur, die allein durch die Verdunstungskälte des Petroläthers nicht gewährleistet ist. Bei Beschickung von 3 Objektträgern pro Kammerfüllung betrug die Stromstärke 75 - 90 mA.

7. Fixation und Wässern

Zum Fixieren werden die Objektträger sofort nach der Elektrophorese eine Stunde lang in ein Äthanol-essigsäuregemisch gelegt (Äthanol 95 ml, Eisessig 5 ml), das ungefähr die gleiche Temperatur wie der Petroläther hatte, um Blasenbildung zu vermeiden. Anschließend erfolgte der Entzug derPuffersalze aus dem Gel durch 17-stündiges Wässern in Aqua dest. Die gewässerten Platten wurden dann im Trockenschrank bei 37 °C bis zum Entstehen eines glatten, farblosen Films getrocknet.

8. Färbung

Zum Färben der Pherogramme wurden folgende Farblösungen verwendet:

Amidoschwarz 10 B (C.I.20470,E.Merck,Darmst.)	0,5	g
Quecksilber(II)chlorid	5,0	g
Eisessig	5,0	ml
Aqua dest. ad	100,0	ml
Ponceau S (C.I.27195,Serva-Lab.,Heidelbg.)	0,6	g
Trichloressigsäure	3,0	g
Aqua dest. ad	100,0	ml
Procion Brillant Blau M-RS(Serva-Lab.,H'bg.)	2,0	g
Essigsäure	10,0	ml
Methanol	50,0	ml
Aqua dest. ad	100,0	ml

Die Pherogramme wurden in einer von JAROFKE (22) beschriebenen Apparatur dem automatisierten Färbe- und Entfärbevorgang ausgesetzt. Die Färbedauer betrug bei Amidoschwarz und Ponceau S 30 Minuten, bei Procion Brillant Blau (MAURER (31) 60 Minuten. Die Entfärbung erfolgte bei Amidoschwarz 4 x 5 Minuten in 2 %iger, bei Ponceau S in 7 %iger Essigsäure (DOWDING und TARNOKY (8)). Procion Brillant Blau wurde zweimal 5 Minuten mit Lösungsmittelgemisch, zweimal 5 Minuten in 7 %iger Essigsäure entfärbt. (MAURER (31))

9. Densitometrische Auswertung

Die Messung der Pherogramme erfolgte mit dem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer in der Transmissionsmeßanordnung. Die Untersuchungen wurden mit einer konstanten Spaltbreite von 0,08 mm und einer Blende von 3,5 mm durchgeführt. Die Justierung der Meßanordnung auf das Pherogramm wurde bei geöffnetem Spalt vorgenommen. Hierbei wurde der Objektträger auf den Leerwert vor der Albuminfraktion in Meßposition gebracht, der Spalt bis auf den Wert von 0,08 mm geschlossen und die Extinktion 0 eingestellt. Zur Registrierung wurde eine Kreuztischgeschwindigkeit

von 15 mm/min. und eine Schreibergeschwindigkeit von 10 cm/min. gewählt. Die aufgezeichnete Kurve eines Pherogramms hatte unter diesen Bedingungen eine Länge von 34 cm; die Auszählung der Integratoreinheiten konnte so unter guten Voraussetzungen durchgeführt werden.
Die Messung erfolgte stets im Extinktionsbereich von 0 - 1. Der zur Registrierung verwendete W + W-Schreiber mit Integrationseinrichtung wurde vor jeder Messung sorgfältig eingestellt. Zur Aufzeichnung der Kurven wurde für das Albumin eine Schreibbreite von 1 Extinktion, für das Globulin eine Schreibbbreite von 0,5 Extinktionen gewählt. Die Eingangsspannung betrug beim 0-Wert (Extinktion 0) 10 mV, beim Vollausschlag (Extinktion 1) 1 mV.
Die Registrierung wurde bei folgenden Wellenlängen vorgenommen: Amidoschwarz 490 nm, Ponceau S 480 nm, Procion Brillant Blau 590 nm.

10. Freie Elektrophorese

Die Freie Elektrophorese erfolgte mit dem Varian Elektrophoreseschreiber nach ANTWEILER (1). Die Elektrophorese wurde in dem von ANTWEILER angegebenen Natriumbarbitalpuffer durchgeführt. Die Stammlösungen wurden mit Aqua bidest. angesetzt.

Stammlösung A — 10,3 g Natriumbarbital ad 100 ml Aqua bidest.

Stammlösung B — 4,37g NaCl und 1,56 g $NaHCO_3$ ad 100 ml Aqua bidest.

Beide Lösungen wurden mit Hilfe eines Schleicher & Schüll-Filters - Nr. 1575 1/2 - filtriert und im Eisschrank aufbewahrt. Vor dem Versuch wurden jeweils aus den Stammlösungen die Lösung I und die Lösung II hergestellt.

Lösung I — 20 ml der Stammlösung A ad 200 ml Aqua bidest.

Lösung II — 100 ml von Lösung I und 1 ml Lösung B +1 ml Aqua bidest.

Zur Elektrophorese wurden 0,5 ml Serum mit 5,5 ml der Lösung I verdünnt, in den Serumkanal der Küvette eingebracht und mit der Lösung II überschichtet. Nach Einsetzen der Elektroden wurde die Elektrophorese 9 1/2 Minuten bei 1,4 mA durchgeführt, und unmittelbar danach wurden die Brechungsgradienten interferometrisch mit dem Varian Elektrophoreseschreiber aufgezeichnet. Für die Durchführung einer Elektrophorese wurden jeweils ca. 25 Minuten benötigt.

IV. Ergebnisse

Die Prüfung der drei Farbstoffe auf das stöchiometrische Verhalten zwischen der Proteindichte und der Farbstoffkonzentration erfolgte an nativen Seren von 6 gesunden Hunden.
Hierzu wurden nach Ermittlung des Albumin-/Globulin-Gehaltes mit den Methoden von KACHANI (24) und RODKEY (41) Verdünnungsreihen mit jeweils 6 bzw. 7 Konzentrationsstufen aufgestellt.
Vor Aufstellung der Eichkurven wurde der methodische Fehler sowohl der Albuminbestimmung nach KACHANI als auch der Globulinbestimmung nach RODKEY ermittelt. Auf der Tabelle 1 sind Einzelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten angegeben. Die Koeffizienten betragen für die Albuminbestimmungsmethode 2,91 %, für das Globulinbestimmungsverfahren 3,02 %.

Vor Beginn der Messung der Pherogramme wurden, um einen direkten Vergleich der jeweils an einem Hund für Albumin bzw. Globulin ermittelten Regressionsgeraden durchführen zu können, drei Punkte gleicher Intensität auf den Absorptionsspektren der Farbstoffe gesucht. Hierzu wurden die Spektren der drei für die Proteinfärbung verwendeten Farbstoffe im Albuminbereich der Pherogramme aufgenommen. Die Albuminkonzentration der auf der Abb. 1 dargestellten Absorptionsspektren betrug 1,55 g%. Wie aus der Abbildung ersichtlich, ergaben sich für Amidoschwarz bei 490 nm, für Ponceau S bei 480 nm und für Procion Brillant Blau bei 590 nm Meßpunkte gleicher Extinktion.

Um die Sicherheit der densitometrischen Messungen der Pherogramme zu überprüfen, wurden die Halbwertsbreiten des Monochromators bei den drei Wellenlängen ermittelt.

Sie betrugen bei einer Spaltbreite von 0,08 mm und der Blende von 3,5 mm für 490 nm 0,88 nm, für 480 nm 0,85 nm, für 590 nm 1,7 nm.
Bei dieser Meßtechnik besteht nicht die Gefahr, daß durch die Messung in der Flanke der Absorptionskurve von Ponceau S der methodische Fehler erhöht wird.
Um zu prüfen, ob sich bei den drei angegebenen Wellenlängen Abweichungen in den Extinktionen der mit den drei Farbstoffen gefärbten Pherogramme ergeben, wurden die Albuminverdünnungsreihen der 6 Hundeseren gemessen und die Integratoreinheiten der aufgezeigten Kurven mit Hilfe der Varianzanalyse auf signifikante Abweichungen geprüft. Die beim Albumin eines Hundeserums ermittelten Integratoreinheiten sind auf der Tabelle 2 dargestellt.
Die Prüfung ergab für die mittleren Integratoreinheiten der Albuminverdünnungsreihen bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % nur zufällige Unterschiede für die drei Farbstoffe.
Dieses Ergebnis zeigt, daß die Messungen nach dem angegebenen Verfahren durchgeführt werden können.
Es wurden nun die Globulinverdünnungsreihen der 6 Hundeseren ausgewertet.

Nach Aufstellung der Eichkurven wurde zuerst geprüft, ob die von 6 Hundeseren unter Anwendung der drei Farbstoffe für Albumin und Globulin erstellten 36 Regressionsgeraden einen linearen Verlauf zeigen.
Für alle Kurven ergibt sich zwischen Farbstoff- und Eiweißdichte ein lineares Verhältnis. Diese Ergebnisse sind auf den Abbildungen 2 - 19 graphisch dargestellt. Mit Hilfe eines Steigungsvergleiches wurde geprüft, ob zwischen den an einem Serum unter Verwendung der drei Farbstoffe ermittelten Albuminregressionsgeraden Unterschiede bestehen.
Die gleiche Analyse wurde für die drei zugehörigen

Globulinregressionsgeraden durchgeführt. Auf Tabelle 3 sind die an den 6 Hundeseren mit Hilfe von Steigungsvergleichen erhaltenen Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.
Es ergibt sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % für alle 6 Hunde, daß die jeweils mit einem Hundeserum erstellten Albuminregressionsgeraden nur zufällige Abweichungen zeigen. Das gleiche gilt für das Globulin mit Ausnahme des Serums von Hund 2.

Es wurde weiter untersucht, ob die Schnittpunkte der 18 Albumin- und 18 Globulinregressionsgeraden mit der Ordinate signifikant vom Koordinatenanfangspunkt abweichen. Es zeigen 17 Globulinregressionsgeraden und 15 Albuminregressionsgeraden hochsignifikante Abweichungen vom Koordinatenanfangspunkt. Die größte signifikante Abweichung beim Globulin betrug 0,19 g% (Hund 4, Procion Brillant Blau), die kleinste noch signifikante Abweichung betrug 0,022 g% (Hund 3, Ponceau S . Für das Albumin ergaben sich 0,109 g% (Hund 1, Amidoschwarz) und 0,0186 g% (Hund 2, Ponceau S).

Von den Untersuchungsreihen an den 6 Hundeseren wurden die Albumin- und Globulinregressionsgeraden der Seren dreier Hunde zur Prüfung der Farbstoffaffinität herangezogen. Da zur Zeit der Aufstellung dieser Versuchsreihen im August des Jahres 1969 die Freie Elektrophorese nach ANTWEILER (1) noch nicht zur Verfügung stand, wurde die Bestimmung des Albumin- und Globulingehaltes der 3 Hundeseren mit Hilfe dieser Methode im Oktober des Jahres durchgeführt. Das aus diesem Verfahren ermittelte Albumin-/Globulin-Verhältnis und der daraus unter Bezugnahme auf den Biuretwert ermittelte g%-Gehalt sind in Tabelle 4 dargestellt. Zur Prüfung der Frage, ob sich das Eiweißbild inzwischen verändert hat, wurde der zu beiden Zeitpunkten

durch Anwendung der Trägerelektrophorese und mit Bezug auf den jeweiligen Biuretwert ermittelte Albumin- und Globulingehalt verglichen. Unter der Annahme der gleichen Anfärbbarkeit der Serumfraktionen zu beiden Zeitpunkten wurden für die g%- und Integratorwerte Umrechnungsfaktoren gebildet. Die im August ermittelten Regressionsgeraden konnten so auf die im Oktober erhaltenen Albumin- und Globulinwerte umgerechnet werden. Sodann wurden die im August ermittelten Albumin-(KACHANI) und Globulinwerte (RODKEY), die zur Aufstellung der Regressionsgeraden verwendet wurden, nachträglich gegen die mit der Freien Elektrophorese erhaltenen Albumin- und Globulinwerte ausgetauscht.
Nach der Einführung der neuen Bezugsgrößen zeigten die Albuminregressionsgeraden einen signifikant steileren Verlauf als die Globulinregressionsgeraden (Abb. 20). Somit wiesen die Albuminfraktionen eine stärkere Farbstoffaffinität auf als die Globuline.

Der methodische Fehler der Untersuchungen an ca. 1900 Pherogrammen betrug bei der höchsten Globulinkonzentration (natives Serum, 126 Einzelwerte) 1,42 %; bei der niedrigsten Globulinkonzentration (40 %iges Serum, 126 Einzelwerte) 4 %.
Entsprechend ergab sich für die höchste Albuminkonzentration (28 %iges Serum, 108 Einzelwerte) 2,20 %; für die niedrigste Albuminkonzentration (8 %iges Serum, 108 Einzelwerte) 8,68 %.
Bei der Routinetechnik zur Ermittlung des Albumingehaltes wird eine 20 %ige Verdünnung verwendet. Hierbei ergab sich ein methodischer Fehler von 3,16 %.

Zur Prüfung der Farbstoffeiweißbindung der mit den 3 Farbstoffen auf dem Träger Agarose gefärbten Pherogramme wurden vergleichende Untersuchungen mit unter-

schiedlichen Entfärbezeiten vorgenommen. Für jeden Farbstoff wurden 12 Pherogramme des nativen und 12 Pherogramme des 1 : 5 verdünnten Serums längeren Entfärbezeiten unterworfen, gemessen und die erhaltenen Integratorwerte denen parallel verlaufender Vergleichsuntersuchungen mit normaler Entfärbezeit gegenübergestellt.
Es ergab sich für Ponceau S nach 100 Minuten Entfärbezeit in 7 %iger Essigsäure bei Albumin und Globulin ein Farbstoffverlust von 12 %, für Amidoschwarz in 2 %iger Essigsäure nach 120 Minuten ein Verlust von 16 %, während bei Procion Brillant Blau auch nach 140 Minuten in 7 %iger Essigsäure noch kein Verlust auftrat. Nach einer Gesamtentfärbezeit von 24 Stunden ergab sich für Procion Brillant Blau ein Farbstoffverlust bei Albumin und Globulin von 8 %, bei Amidoschwarz von 22 % und bei Ponceau S von 24 %.

Die Untersuchung von 47 Schäferhundseren auf ihr Albumin-/Globulin-Verhältnis erfolgte mit der Agarose-Gelelektrophorese in 6-fach Bestimmungen. Es ergab sich dabei ein durchschnittliches Albumin-/Globulin-Verhältnis von 57,04 % zu 42,96 % mit einer Standardabweichung von $\pm$ 0,45 g%. Der mittlere Gesamteiweißwert betrug 7,01 g%.

V. Diskussion

Aus der Literaturübersicht geht hervor, daß die quantitative Papierelektrophorese ein Verfahren ist, dessen Ergebnisse selbst bei Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen nur für den jeweiligen Untersucher von diagnostischer Bedeutung sind. Es ist mit dieser Methode nicht möglich, die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Serumproteine zu klären.
PEZOLD (36) unterstreicht diese Ansicht, indem er auf die große Zahl von Arbeiten hinweist, die differierende Ergebnisse für die Farbstoffaffinität zeigen, und die Schwierigkeit darlegt, mit Hilfe von Korrekturfaktoren einheitliche Voraussetzungen zu schaffen. Er sagt in Übereinstimmung mit anderen Autoren, daß zumindest bei pathologischen Seren Korrekturfaktoren unbrauchbar sind.

Die Literatur über die Celluloseacetatelektrophorese zeigt, daß auch mit dieser Methode die Frage der Farbstoffaffinität nicht geklärt ist. BUSSE und DULCE (3), DITTMER und TLACH (7) führen in die Diskussion einen nach ihrer Ansicht die Ergebnisse entscheidend beeinflussenden Faktor, die Reinheit der Farbstoffe ein.

SIEGERT, SCHÜTZLER und JAROFKE (44) halten die quantitative Elektrophorese auf Agarose-Gel in der von ihnen modifizierten Form der WIEME-Technik zur Prüfung des Einflusses der Farbstoffe auf quantitative Ergebnisse und zur Bestimmung der Farbstoffaffinität für eine besonders geeignete Methode. Im Gegensatz zur Celluloseacetatelektrophorese können bei diesem Verfahren definierte Proteinmengen völlig gleichmäßig auf das Agarose-Gel aufgetragen werden. Wie die in diesem Institut durchgeführten Untersuchungen zeigen, besteht bei der Methode ein streng stöchiometrisches Verhalten zwischen Farbstoff- und Proteindichte.

Der von OSBORN (32) in Betracht gezogene Einfluß der Pufferanionen auf die Anfärbung der Proteine ist bei dem Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese nach SIEGERT, SCHÜTZLER und JAROFKE vollkommen durch die Wässerung der Gelträger ausgeschaltet. In diesem Institut konnte durch Extraktion der gewässerten Gelplatten nachgewiesen werden, daß nach Wässerungszeiten von 17 Stunden der Barbitalpuffer aus dem Gel vollständig entfernt wurde. Im Hinblick auf die Arbeit von RIEDER und NUSSELT (40) erscheint es als wichtig, darauf hinzuweisen, daß die Auswertung der bei Einsatz des unverdünnten Serums tiefgefärbten Albuminfraktion in geteilten Meßbereichen bis zur Extinktion 3 zu unnötigen Fehlern führt. Die Proteindichte im Albuminbereich beträgt bei der Elektrophorese des unverdünnten Serums mit 4 g% Albumin ca. 2,6 /mm^2. Das ist jedoch eine Proteindichte, bei welcher nach in der Literatur vorliegenden Ergebnissen eine strenge Linearität zwischen Farbstoff und Protein nicht gewährleistet ist (HEIDE und BIEL (17), OSBORN (32)).
Abgesehen davon widerspricht eine Messung in den Extinktionsbereichen über 3 den bei der Photometrie einzuhaltenden Prinzipien.

Der Einsatz der Elektrophorese auf Agarose-Gel zur Prüfung des Einflusses von Farbverunreinigungen auf das quantitative Ergebnis erscheint geeigneter als das von BUSSE und DULCE (3) angegebene Verfahren, bei welchem bestimmte Mengen an Proteinreinfraktionen mit einer Agla-Spritze auf einer definierten Fläche auf dem Träger Celluloseacetat gleichmäßig verteilt, fixiert, gefärbt und eluiert werden. Nach PEZOLD (36) ist die Anwendung von Reinfraktionen zur Prüfung von Farbstoffaffinitäten umstritten. Zweckmäßiger erscheint der Einsatz von nativem Serum.

Für die Prüfung von Farbstoffen ist eine genaue Konzentrationsermittlung einzelner Fraktionen nicht notwendig, sofern der Farbstoffvergleich jeweils innerhalb eines Serums vorgenommen wird.
Es wurden in dieser Arbeit mit dem von BUSSE (2) als rein bezeichneten Azofarbstoff Ponceau S dem als uneinheitlich definierten Azofarbstoff Amidoschwarz 10 B sowie mit dem Reaktivfarbstoff Procion Brillant Blau Verdünnungsreihen von Seren 6 gesunder Hunde aufgestellt. Der Steigungsvergleich der jeweils aus ca. 48 Einzelwerten errechneten und auf den Abbildungen 2 - 19 dargestellten Albumin- und Globulinregressionsgeraden läßt den Schluß zu, daß die Anwendung der Farbstoffe zu keinem unterschiedlichen quantitativen Ergebnis führt (s.Tabelle 3). Es ist nicht anzunehmen, daß die signifikante Abweichung der auf den Abbildungen 5 - 7 dargestellten Globulinregressionsgeraden des Serums von Hund 2 diese Aussage in Frage stellt.
Dieses von Hundeseren erhaltene Ergebnis steht im Gegensatz zu dem von BUSSE und DULCE (3) an Human-Reinfraktionen und von FAZEKAS et al.(10) an Human- und Tier-Reinfraktionen erhobenem Befund. Diese Autoren weisen die Nichtlinearität für den Farbstoff Amidoschwarz auf dem Träger Celluloseacetat nach. Dem Einwand, daß in dieser Arbeit die Globulinfraktionen nicht einzeln untersucht wurden, sei entgegengehalten, daß sich die Summe der Fraktionen hinsichtlich der Frage der Linearität wie die Einzelfraktionen verhält. Dieses ist um so mehr der Fall,als kleine Streuungen ermittelt wurden.

Die bei dem Farbstoffvergleich ermittelten Regressionsgeraden wurden mit Hilfe des t-Testes auf ihre Abweichungen geprüft. Danach weichen 17 Globulinregressionsgeraden und 15 Albuminregressionsgeraden hochsignifikant vom Koordinatenanfangspunkt ab. Bedingt durch die geringe Streuung um die Albumin-, (7-12 IE)

und Globulinregressionsgeraden (15-20 IE) werden Abweichungen vom Koordinatenanfangspunkt bereits signifikant, die bei der Auswertung praktisch keine Rolle spielen (s.Abb. 2-19).

Von diesem Untersuchungsmaterial wurden die Werte von den Seren der Hunde 2, 4, 6 zur Prüfung der Frage der Farbstoffaffinität von Albumin und Globulin verwendet. Es wird daran erinnert, daß zur Konzentrationsermittlung für die Errechnung der Regressionsgeraden beim Farbstoffvergleich die in sich gut reproduzierbaren Albumin- und Globulinbestimmungsverfahren nach KACHANI (24) und RODKEY (41) verwendet wurden.
Nach den Untersuchungen von HENNEMANN (18) waren die nach diesem Verfahren ermittelten Albuminwerte im Vergleich zur Trägerelektrophorese stets zu hoch, die Globulinwerte entsprechend zu niedrig. Es wurde nun versucht, diese so in Frage gestellten Werte durch Serumanalysen mit der Freien Elektrophorese durch das im Abschnitt "Ergebnisse" beschriebene Verfahren nachträglich zu überprüfen.
Die aus den umgerechneten Werten dargestellten Regressionsgeraden für Albumin und Globulin der Seren für Hund 2, 4, 6 sind auf der Abbildung 20 zu sehen. Die Ergebnisse des Steigungsvergleiches vom Albumin und Globulin zeigen eine signifikante größere Farbstoffaffinität des Albumins.

Über die Freie Elektrophorese des Hundeserums sind noch weitere Untersuchungen erforderlich. Aus der Literatur geht hervor, daß die Brechungsindices für die einzelnen Serumfraktionen nur geringfügig voneinander abweichen (SCHOLTAN et al.(49), PERLMAN und LONGSWORTH (35)). Der methodische Fehler des in dieser Versuchsanordnung verwendeten Interferenzverfahrens mit weißem Licht nach ANTWEILER (1) weist nach persönlicher Mitteilung einen Fehler von ca. 1 % auf.

Eigene Untersuchungen ergaben für das Hundeserum einen methodischen Fehler von 7,67 %. Das Ergebnis der Freien Elektrophorese kann bei lipämischen Seren durch den höheren Brechungsindex der Lipoidsubstanzen verfälscht werden (ESSER et al. (9)).

Bei Anwendung verschiedener Entfärbezeiten ergab sich für Ponceau S im Vergleich zu Amidoschwarz eine stärkere Abnahme der Farbstoffintensität der Pherogramme. Bei dem Farbstoff Procion Brillant Blau konnte auch bei Entfärbezeiten von 140 Minuten kein Verlust festgestellt werden.
Die Zeitspanne nach der normalen automatisierten Entfärbezeit bis zum Wahrnehmen eines Farbstoffverlustes von z.B. 12 % bei Ponceau S ist mit 80 Minuten sehr groß. Während FAZEKAS et al. (10) auf dem Träger Celluloseacetat für die meisten Farbstoffe - außer Procion Brillant Blau - feststellten, daß nur eine sehr genaue Standardisierung der Entfärbezeiten eine Farbstoffabnahme der Pherogramme verhindert, zeigen die vorliegenden Untersuchungen, daß Entfärbezeiten bis zu einer Stunde für die quantitativen Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese unbedeutend sind.
Bemerkenswert ist, daß bei dem Farbstoff Procion Brillant Blau erst nach 24-stündiger Entfärbezeit ein Farbstoffverlust von 8 % zu finden ist, so daß die Möglichkeit der von FAZEKAS et al. (10) angegebenen kovalenten Bindung auch im sauren Bereich nicht auszuschließen ist.

VI. Zusammenfassung

Mit der Methode der Agarose-Gelelektrophorese wurden die Farbstoffe Amidoschwarz 10 B, Ponceau S und Procion Brillant Blau M-RS auf das stöchiometrische Verhalten zwischen Proteindichte und Farbstoffkonzentration an 6 Hundeseren geprüft.
Alle unter Anwendung der 3 Farbstoffe für Albumin und Globulin aufgestellten 36 Regressionsgeraden zeigten einen linearen Verlauf. Mit Hilfe von Steigungsvergleichen wurden für die an jeweils einem Hund unter Anwendung der 3 Farbstoffe aufgestellten Albuminregressionsgeraden nur zufällige Abweichungen ermittelt. Das gleiche gilt mit Ausnahme eines Hundeserums für das Globulin.
Hieraus folgt, daß alle drei Farbstoffe für die quantitative Agarose-Gelelektrophorese geeignet sind.

Mit Hilfe der Freien Elektrophorese wurde die Albumin- und Globulinkonzentration nativer Seren bestimmt, um die Farbstoffaffinität zu prüfen. Dabei ergab sich eine stärkere Anfärbbarkeit des Albumins.

Der durch Auswertung von ca. 1900 Pherogrammen ermittelte Schätzwert des methodischen Fehlers betrug für die Albuminbestimmung (20 % Serum) 3,16 %, für die Globulinbestimmung 1,42 %.

Entfärbeversuche zeigten, daß der Reaktivfarbstoff Procion Brillant Blau fester an das Eiweiß gebunden ist als die Azofarbstoffe Ponceau S und Amidoschwarz.

Es wurden die Seren von 47 gesunden Schäferhunden unter Einsatz der Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Amidoschwarz auf ihr Albumin-/Globulin-Verhältnis untersucht. Das durchschnittliche Albumin-/Globulin-Verhältnis beträgt 57,04 % zu 42,96 % mit einer Standardabweichung von $\pm$ 0,45 g%. Als durchschnittlicher Gesamteiweißwert wurde 7,01 g% errechnet.

VI. Summary

The method of agarose-gel-electrophoresis was applied to test the dyes amidoblack 10 B, Ponceau S, and Procion brilliant blue M-RS with regard to the stoichiometrical reaction between protein and dye concentrations in six dog sera.
All of the 36 regression lines established for albumin and globulin on application of the three dyes showed a linear course. By comparison of increasing values only random deviations could be determined for the albumin regression lines established in respect of each dog on application of the three dyes. With the exception of one dog serum, the same applies to globulin.
Hence follows that all three dyes are suitable for quantitative agarose-gel-electrophoresis.

By means of free electrophoresis the albumin and globulin concentrations of native sera were determined to examine the dye-affinity. This revealed a greater dye-affinity of the albumin.

The estimate rate of the methodical error determined by evaluation of approximately 1 900 pherogrammes amounted to 3.16 % for the albumin determination (20 % serum) and to 1.42 % for the globulin determination.

Decolorization tests revealed that the absorptive power of the reactive dye Procion brilliant blue in respect to protein is stronger than that of the azo dyes Ponceau S and amidoblack.

The sera of 47 healthy Alsatian dogs were examined by means of agarose-gel-electrophoresis and dyeing with amidoblack in order to determine their albumin-/globulin-rate. The average albumin-/globulin-rate is 57.04 % to 42.96 % with a standard deviation of ± .45 g%. 7.01 g% was established as the average total serum protein value.

VII. Literaturverzeichnis

1. ANTWEILER, H.J.:

Die quantitative Elektrophorese in der Medizin.

Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 2.Auflage (1957)

2. BUSSE, V.:

Papierchromatographische Untersuchungen von zur Anfärbung von Elektropherogrammen benutzten Farbstoffen.

Z.klin.Chem.u.klin.Biochem. 6, 273 (1968)

3. BUSSE, V. und H.J. DULCE:

Bestimmung von Korrekturfaktoren für die Farbstoff-Proteinbindung bei der Folien-Elektrophorese.

Z.klin.Chem. u.klin.Biochem. 7, 486 (1969)

4. CREMER, H.D. und A. TISELIUS:

Elektrophorese von Eiweiß in Filterpapier.

Biochem. Zschr. 320, 293 (1950)

5. DAVIDSEN, O.:

Fixation of proteins after agarosegel electrophoresis by means of picric acid.

Clin.Chim.Acta, 21, 205 (1968)

6. DITTMER, A.:

Papierelektrophorese, Grundlagen-Methodik-Klinik.

VEB Gustav Fischer-Verlag (1961), 2.Auflage

7. DITTMER, A. und K.F. TLACH:

Fremdfarbstoffe als Nebenkomponenten verschiedener Amidoschwarz 10-B-Chargen und deren Einflüsse auf die Ergebnisse der Papierelektrophorese.

Acta biol. med. german. 18, 541 (1967)

8. DOWDING, B. und A.L. TARNOKY:

zit. nach MAURER

Proc. Assoc. Clin. Biochem. 4, 18 (1966)

9. ESSER, H., Fr. HEINZLER, F. KAZMEIER und W. SCHOLTAN:

Vergleichende Untersuchungen über die Trennung der Serumeiweißfraktionen mittels der Papierelektrophorese und der Elektrophoreseapparatur nach TISELIUS.

Ärztl.Forsch. 6, 156 (1952)

10. FAZEKAS de St. GROTH, S., R.G. WEBSTER, and A. DATYNER:

Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips.

Biochem. Biophys. Acta, 71, 377 (1963)

11. FRICKE, E.:

Untersuchungen zur Methodik der Protein- und Lipoproteindarstellung des Serums gesunder Hunde mit Hilfe der Agargelelektrophorese.

Vet.Med.Diss. Freie Universität Berlin (1963)

12. FRIEDMAN, H.S.:

A standardized procedure for serum protein electrophoresis on cellulose acetat membrane strips.

Clin.Chim. Acta, 6, 775 (1961)

13. GORDON, A.H., B. KEIL, and K. SEBESTA:

Electrophoresis of proteins in agar jelly.

Nature, 164, 498 (1949)

14. GRABAR, P., and C.A. WILLIAMS:

Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.

Biochim. Biophys. Acta, 10, 193 (1953)

15. GRAHAM, J.L., and B.W. GRUNBAUM:

A rapid method for microelectrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate.

Amer. J. Clin. Path. 39, 567 (1963)

16. GRASSMANN, W. und K. HANNIG:

Beiträge zur Methodik der Papierelektrophoretischen Serumanalyse.

Klin. Wschr. 32, 838 (1954)

17. HEIDE, K. und H. BIEL:

Korrektur der bei Transparenzmessungen von Papierelektrophoresen auftretenden Störungen.

Behringwerk-Mitt. 35, 75 (1958)

18. HENNEMANN, B.:

Beiträge zur Elektrophorese des Hundeserums auf Zelluloseazetat und Agarosegel und zur Anfärbbarkeit von Albumin und Globulin.

Vet.Med.Diss. Freie Universität Berlin (1969)

19. HENRY, R.J., O.J. GOLUB, and C. SOBEL:

Some of the variables involved in the fractionation of serum proteins by paper electrophoresis.

Clin. Chem. 3 , 49 (1957)

20. HOPFF, H.:

Über den Mechanismus der Farbstoffbindung.

Naturwissenschaften, 56, 67 (1969)

21. JANSEN, M.T.:

On the quantitative amidoblack staining of protein spots in agar gel at local protein concentrations.

Biochim. Biophys. Acta, 60, 121 (1962)

22. JAROFKE, D.:

Ein Beitrag zur quantitativen Albumin- und Globulinbestimmung im Serum gesunder Hunde mit der Agargelelektrophorese und chemischen Methoden.

Vet.Med.Diss. Freie Universität Berlin (1966)

23. JENCKS, W.P., M.R. JETTON, and E. DURRUM:

Paper electrophoresis as a quantitative method.

Biochem. J. 60, 205 (1955)

24. KACHANI, Z.F.Chr.:

Zur kolorimetrischen Albuminbestimmung im Serum.

Zschr.f.klin.Chem. 2, 91 (1964)

25. KOHN, J.:

A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis.

Clin.Chim.Acta, 2, 297 (1957)

26. KREUTZER, H.J.H.:

Protein concentration and dye uptake after agar gel electrophoresis.

Clin.Chim.Acta, 12, 575 (1965)

27. LATNER, A.L., and D.C. PARK:

Quantitative filter paper electrophoresis by means of reflectance densitometry.

Clin.Chim.Acta, 11, 538 (1965)

28. LEWIN, J., and P. HILLION:

zit. nach SUNDERMANN
Ann. biol. clin. 14, 22 (1956)

29. MACKAY, I.R., W. VOLWILER, and P.D. GOLDSWORTHY:

Paper electrophoresis of serum proteins: photometric quantitation and comparison with free electrophoresis.
J.Clin.Invest. 33, 855 (1954)

30. MATTENHEIMER, H.:

Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium.
Verlag de Gruyter & Co., Berlin (1961)

31. MAURER, R.H.:

Disk-Elektrophorese.
Verlag de Gruyter & Co., Berlin (1968)

32. OSBORN, D.A.:

Dye binding by protein as applied to quantitative paper electrophoresis.
Clin.Chim.Acta, 5, 777 (1960)

33. OTT, H., H. HUBER und G. KÖRVER:

Ein Vergleich der Elektrophoresemethoden nach TISELIUS, ANTWEILER und TURBA.
Klin. Wschr. 30, 34 (1952)

34. PERL, H.W. und K.H. VOGGEL:

Zur Standardisierung elektrophoretischer Trennverfahren auf Celluloseacetatmembranen.
G-I-T, 13, 439 (1969)

35. PERLMAN, G., and L.G. LONGSWORTH:

The specific refractive increment of some purified proteins.
Am.Soc. 70, 2719 (1948)

36. PEZOLD, F.A.:

Kritische Bemerkungen zur Anwendung der Papierelektrophorese in der ärztlichen Diagnostik.

Ärztl.Wschr. 13, 129 (1958)

37. PEZOLD, F.A. und U. PEISER:

Untersuchungen über die Affinität papierelektrophoretisch aufgetrennter und denaturierter Serumproteinfraktionen gegenüber den Eiweißfarbstoffen Amidoschwarz, Azokarmin und Bromphenolblau.

Klin. Wschr. 31, 982 (1953)

38. REINERT, G.:

Die Bindung von Reaktivfarbstoffen an Kollagen.

Math.Nat.Diss. Aachen (1967)

39. RICE, J.D., Jr. and B. BLEAKNEY:

Electrophoresis of unconcentrated cerebrospinal fluid using cellulose acetate strips and the dye nigrosin.

Clin.Chim.Acta, 12, 343 (1965)

40. RIEDER, H.P. und L. NUSSELT:

Serumproteine in der Agargel-Elektrophorese; Auswertung, Normalbereiche, Altersabhängigkeit.

Clin.Chim.Acta, 24, 159 (1969)

41. RODKEY, F.L.:

Separation and determination of the total globulins of human serum.

Clin.Chem. 11, 489 (1965)

42. SAMMONS, H.G., and P.H. WHITEHEAD:

A method of quantitative serum protein electrophoresis.

Clin.Chim.Acta, 8, 673 (1963)

43. SCARDI, V., and V. BONAVITA:

The interaction between dyes and serum proteins in paper electrophoresis.

Clin.Chim.Acta, 4, 322 (1959)

44. SIEGERT, M., G. SCHÜTZLER und D. JAROFKE:

Quantitative Bestimmung der Serumproteine und Prüfung ihrer Farbstoffaffinität mit der Agargelelektrophorese.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 82, 42(1969)

45. SIMON, K.:

Fehlerquellen der Papierelektrophorese.

Zschr. inn. Med. 12, 113 (1957)

46. SLATER, R.J., and H.G. KUNKEL:

Filter paper electrophoresis with special reference to urinary proteins.

J.Lab.Clin.Med. 41, 619 (1953)

47. SUNDERMAN, F.W. jr.,and F.W. SUNDERMAN:

Studies of the serum proteins:
IV: The dye binding of purified serum proteins separated by continous-flow electrophoresis.

Clin.Chem. 5, 171 (1959)

48. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und H. KNOPFF:

Die Bedeutung kombinierter Färbeverfahren nach immunoelektrophoretischer Analyse pathologischer Seren.

Acta haemat. 26, 169 (1961)

49. SCHOLTAN, W., F.E. SCHMENGLER, H.ESSER, Fr.HEIZLER, F. KAZMEIER, K.HINSBERG und K.JAHNKE:

Vergleichende Untersuchungen zur Bewertung der neueren Methoden der Eiweißbestimmung in Serum und Plasma.

Ärztl. Forsch. 6, 145 (1952)

50. SCHWENKE, R. und G. GEYER:

Zur Anwendung von Reaktivfarbstoffen.
Acta Histochem. 24, 366 (1966)

51. TURBA, F. und A.J. ENENKEL:

Elektrophorese von Proteinen in Filterpapier.
Naturwissenschaften, 37, 93 (1950)

52. URIEL, J.:

Interprétation quantitative des résultats après électrophorèse en jélose.
Clin.Chim.Acta, 3, 234 (1958)

53. VICKERSTAFF, T.:

Prinzipien des Färbens mit Reaktivfarbstoffen.
Textil-Rundschau, 13, 267 (1958)

54. VREEDENDAAL, M. van:

Fixation after agar gel electrophoresis.
Clin. Chim. Acta, 15, 359 (1967)

55. WEBSTER, D.:

A simple method of serum protein fractionation on cellulose acetate.
Clin. Chim. Acta, 11, 101 (1965)

56. WEICHSELBAUM, T.E.:

zit. nach KACHANI.
Amer. J. Clin. Path. (Techn. Sect.) 10, 40(1946)

57. WIEME, R.J.:

Agar gel electrophoresis.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam/London/ New York (1965)

58. WUNDERLY, Ch.:

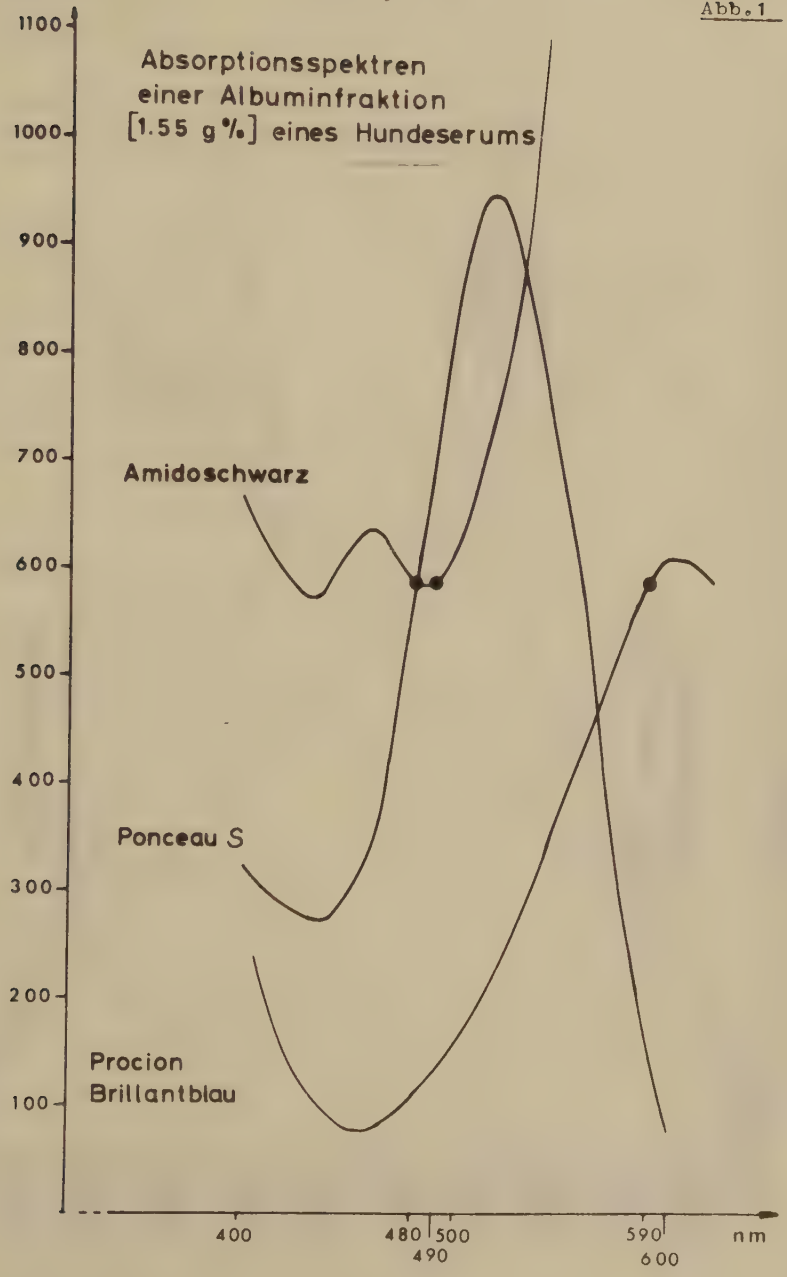
Die Papierelektrophorese.
Verlag H.R. Sauerländer & Co., Aachen und Frankfurt/M., 2.Auflage (1959)

59. ZOLLINGER, H.:

Chemie der Azofarbstoffe.
Birkhäuser Verlag Basel (1958)

VIII. Abbildungen 1 - 20

Abb. 1


Ext.
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
Absorptionsspektren
einer Albuminfraktion
[1.55 g%] eines Hundeserums
Amidoschwarz
Ponceau S
Procion
Brillantblau
400
480
490
500
590
600
nm

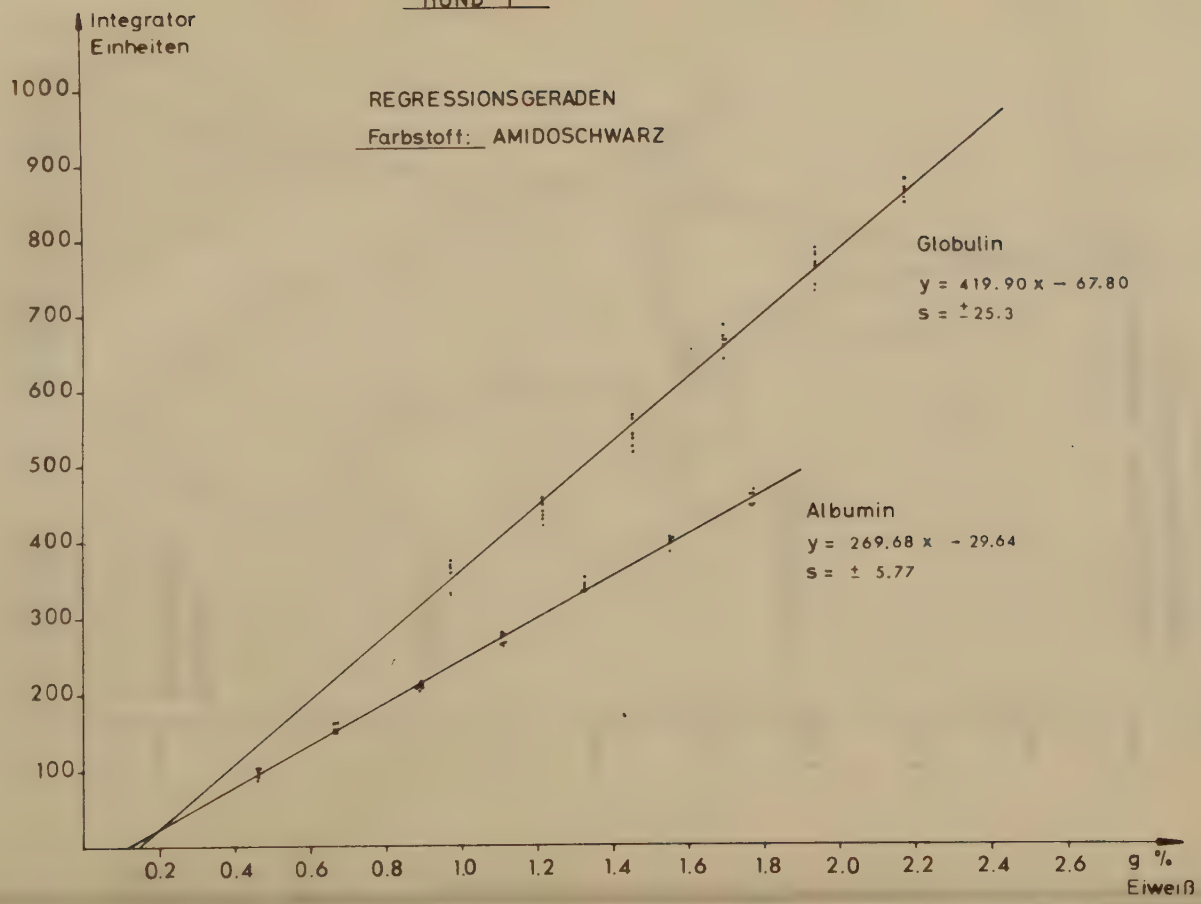

HUND 1
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: AMIDOSCHWARZ
Globulin
y = 419.90 x − 67.80
s = ± 25.3
Albumin
y = 269.68 x − 29.64
s = ± 5.77
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 2

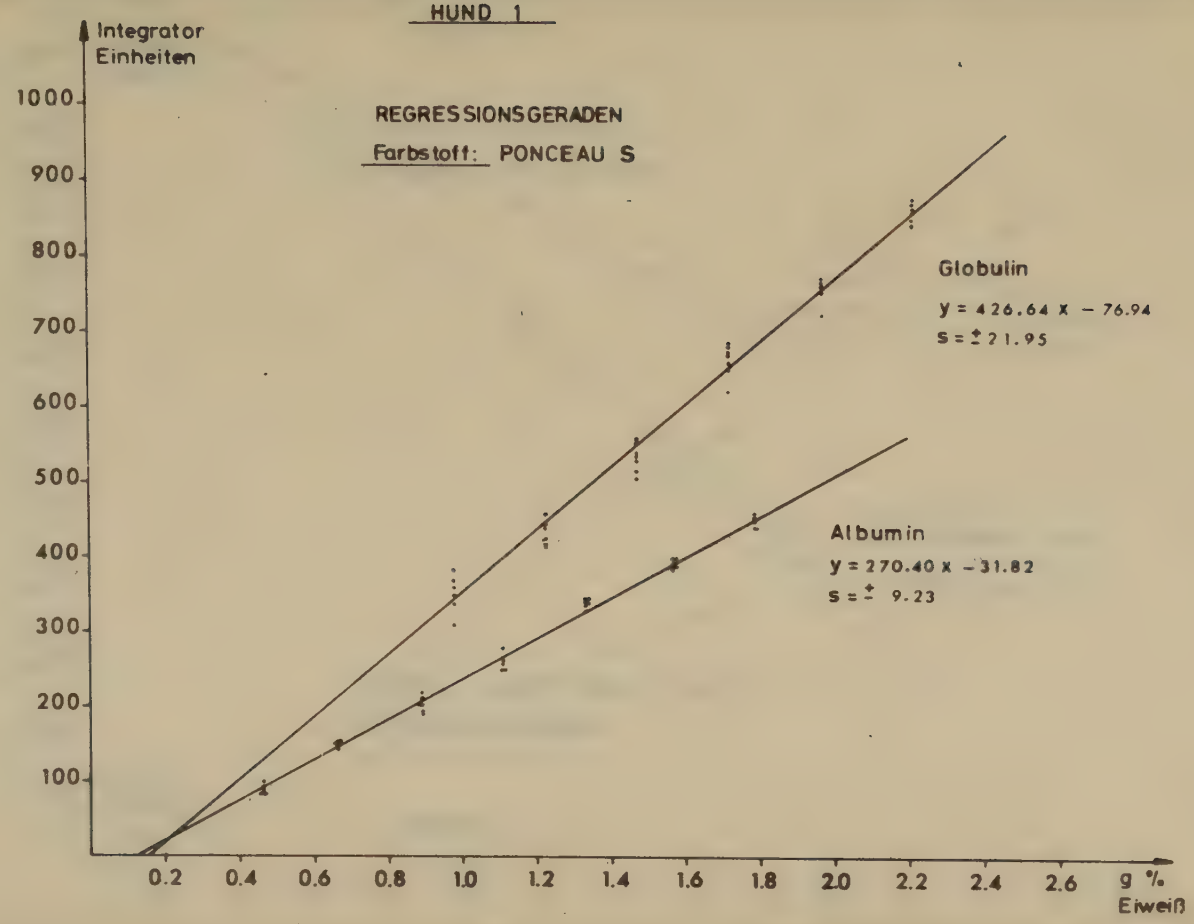

HUND 1
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PONCEAU S
Globulin
y = 426.64 x − 76.94
s = ± 21.95
Albumin
y = 270.40 x − 31.82
s = ± 9.23
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 3

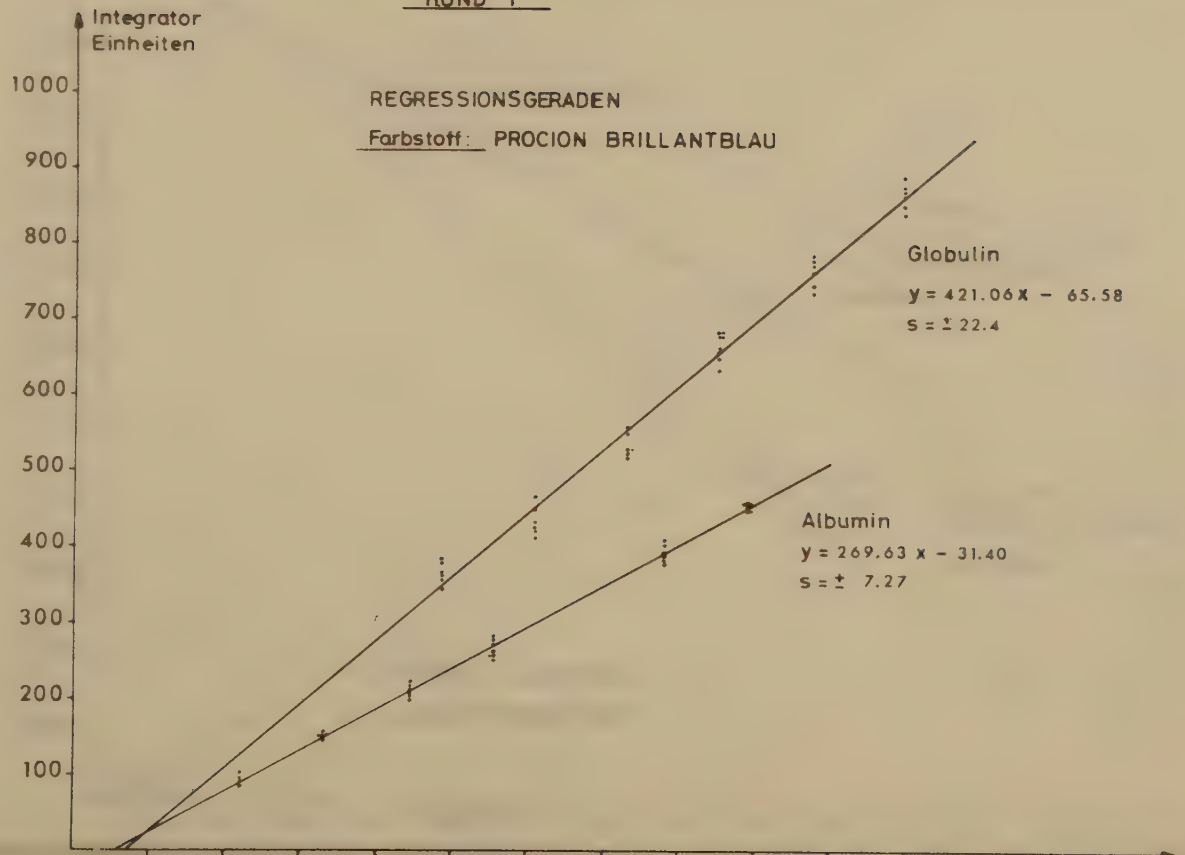

HUND 1
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PROCION BRILLANTBLAU
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
Globulin
y = 421.06 x - 65.58
s = ± 22.4
Albumin
y = 269.63 x - 31.40
s = ± 7.27
g %

Abb. 4

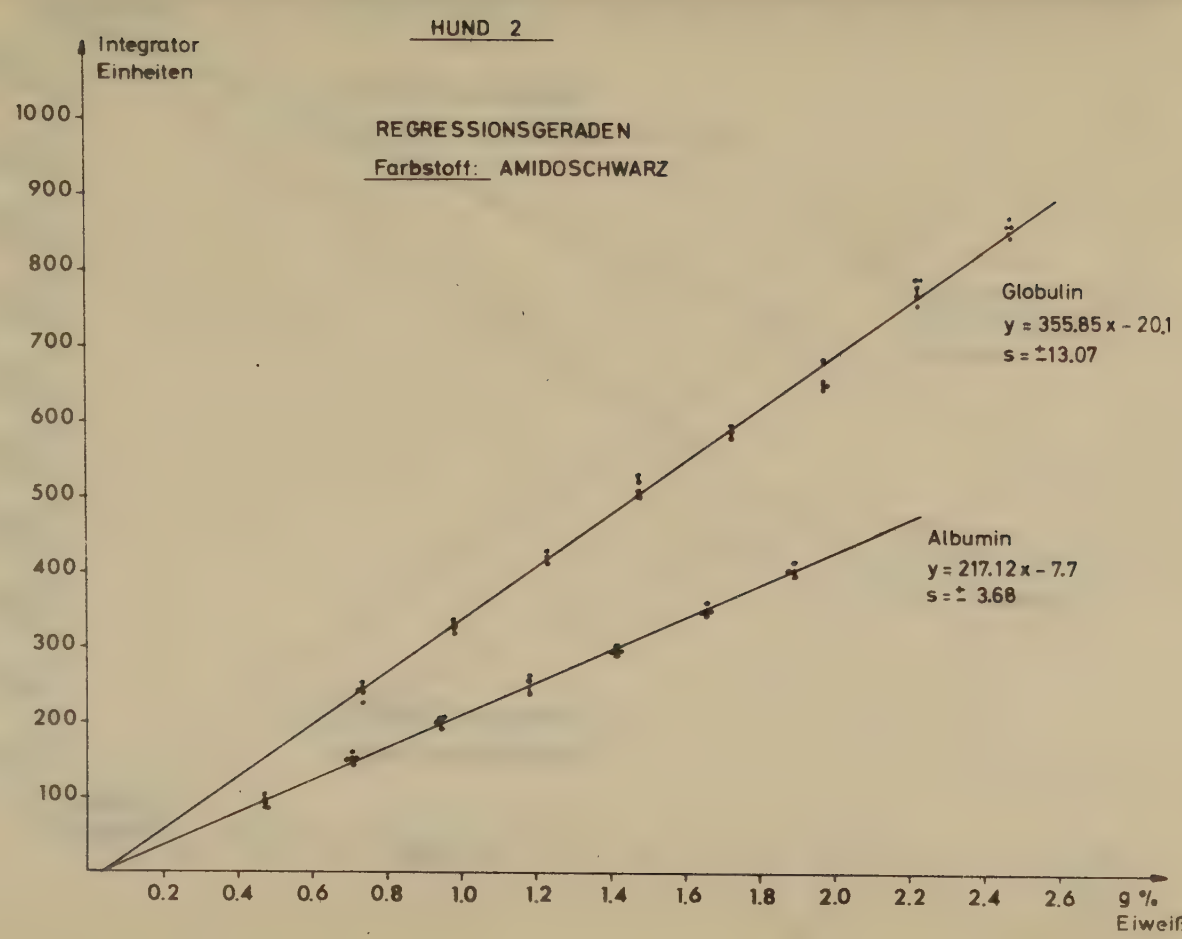

HUND 2
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: AMIDOSCHWARZ
Globulin
y = 355.85 x - 20.1
s = ±13.07
Albumin
y = 217.12 x - 7.7
s = ± 3.68
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 5

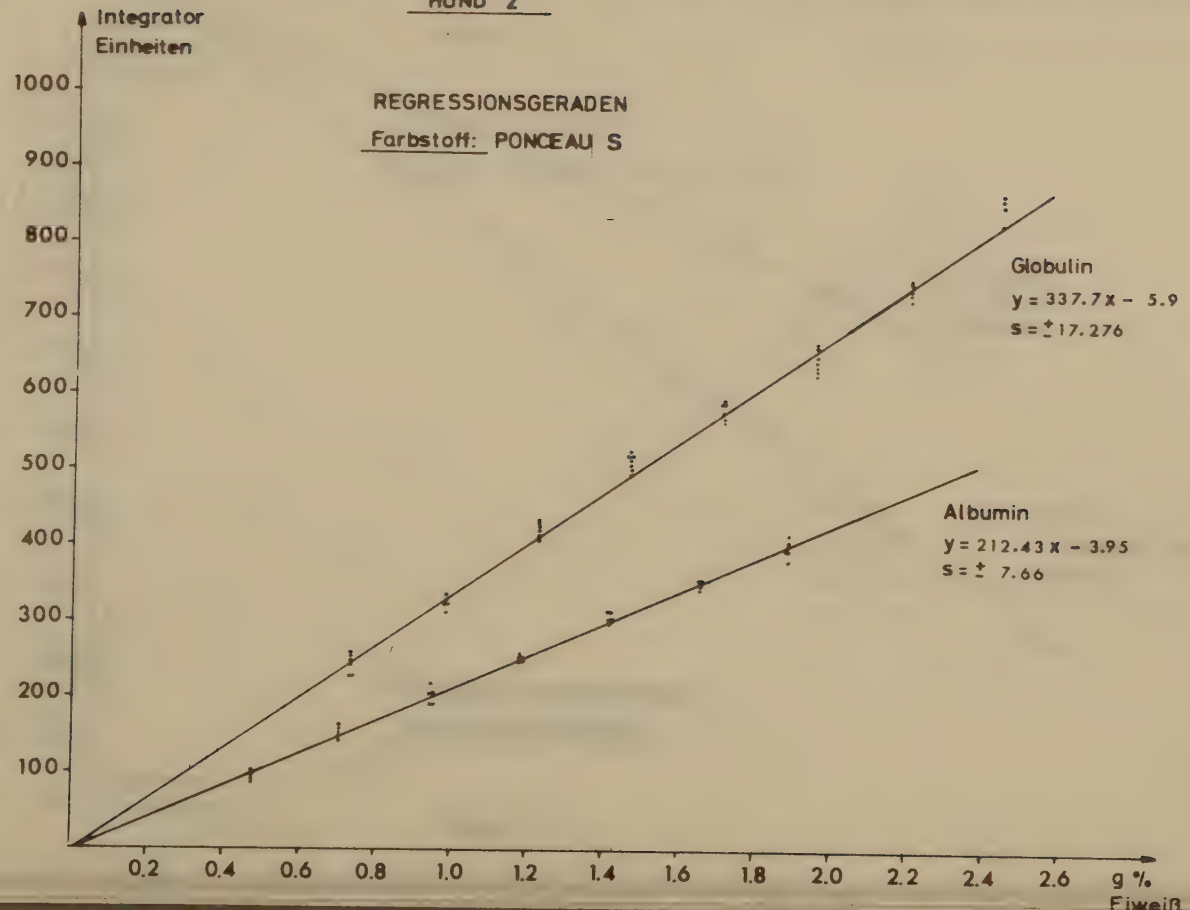

HUND 2
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PONCEAU S
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
Globulin
y = 337.7x - 5.9
s = ± 17.276
Albumin
y = 212.43x - 3.95
s = ± 7.66
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 6

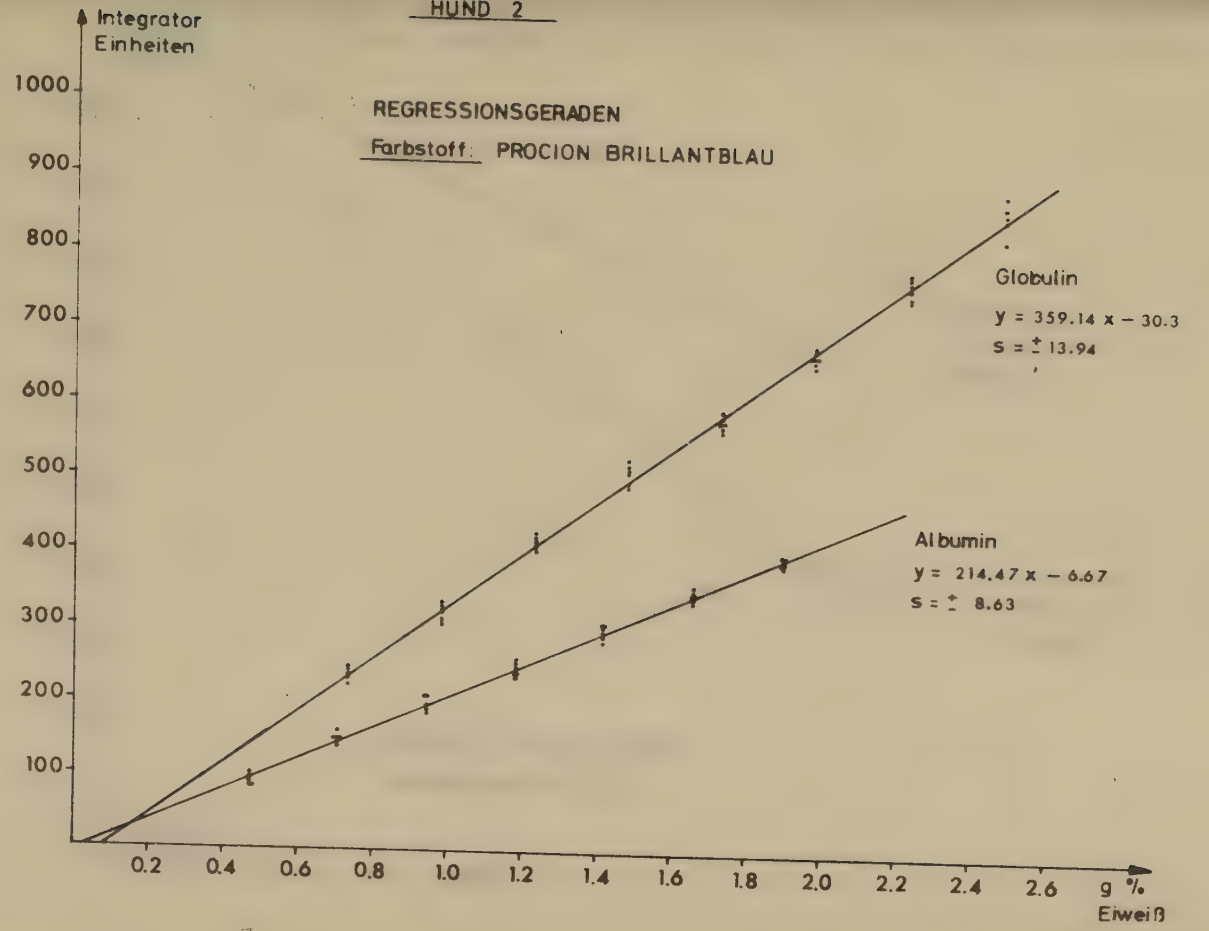

HUND 2
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PROCION BRILLANTBLAU
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
Globulin
y = 359.14 x − 30.3
s = ± 13.94
Albumin
y = 214.47 x − 6.67
s = ± 8.63
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 7

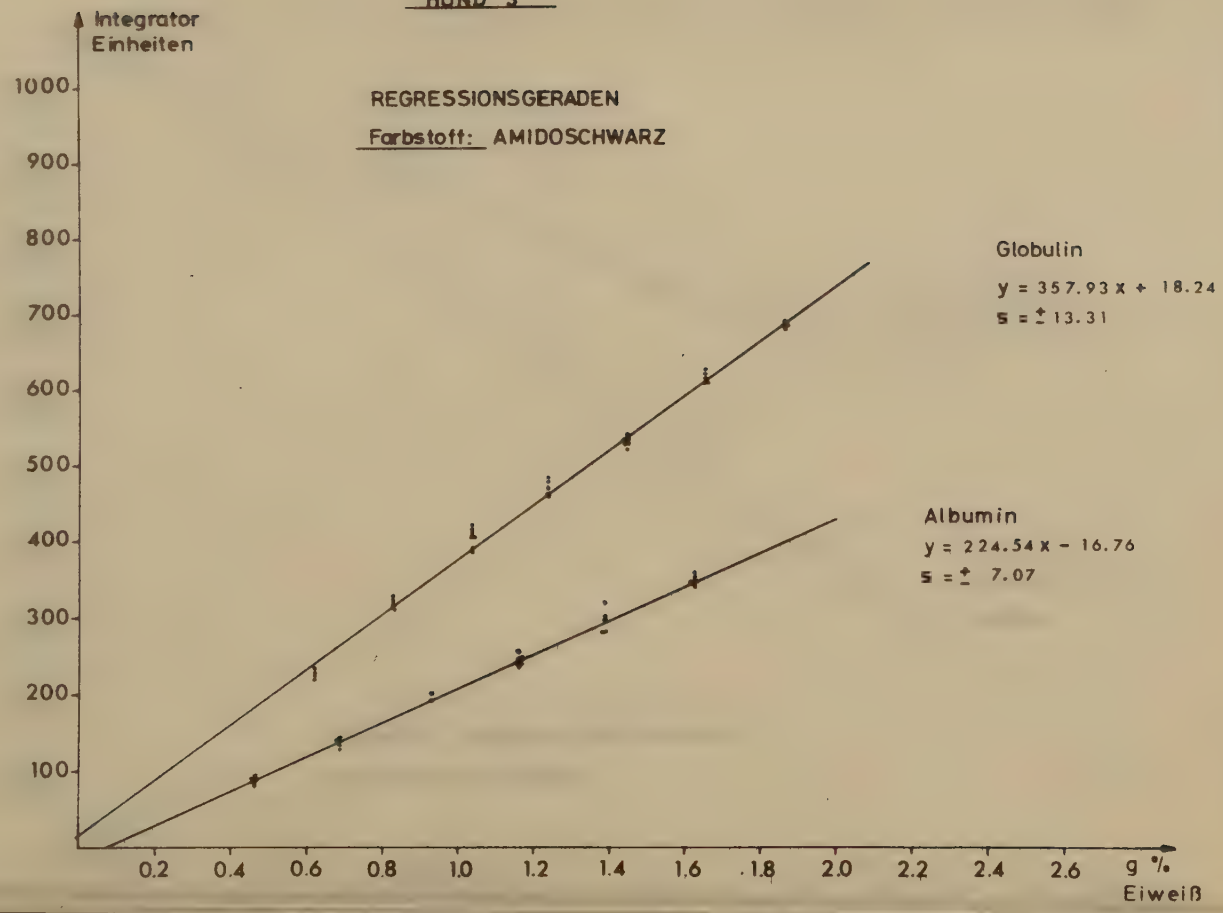

HUND 3
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: AMIDOSCHWARZ
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
Globulin
y = 357.93 x + 18.24
s = ± 13.31
Albumin
y = 224.54 x - 16.76
s = ± 7.07
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 8

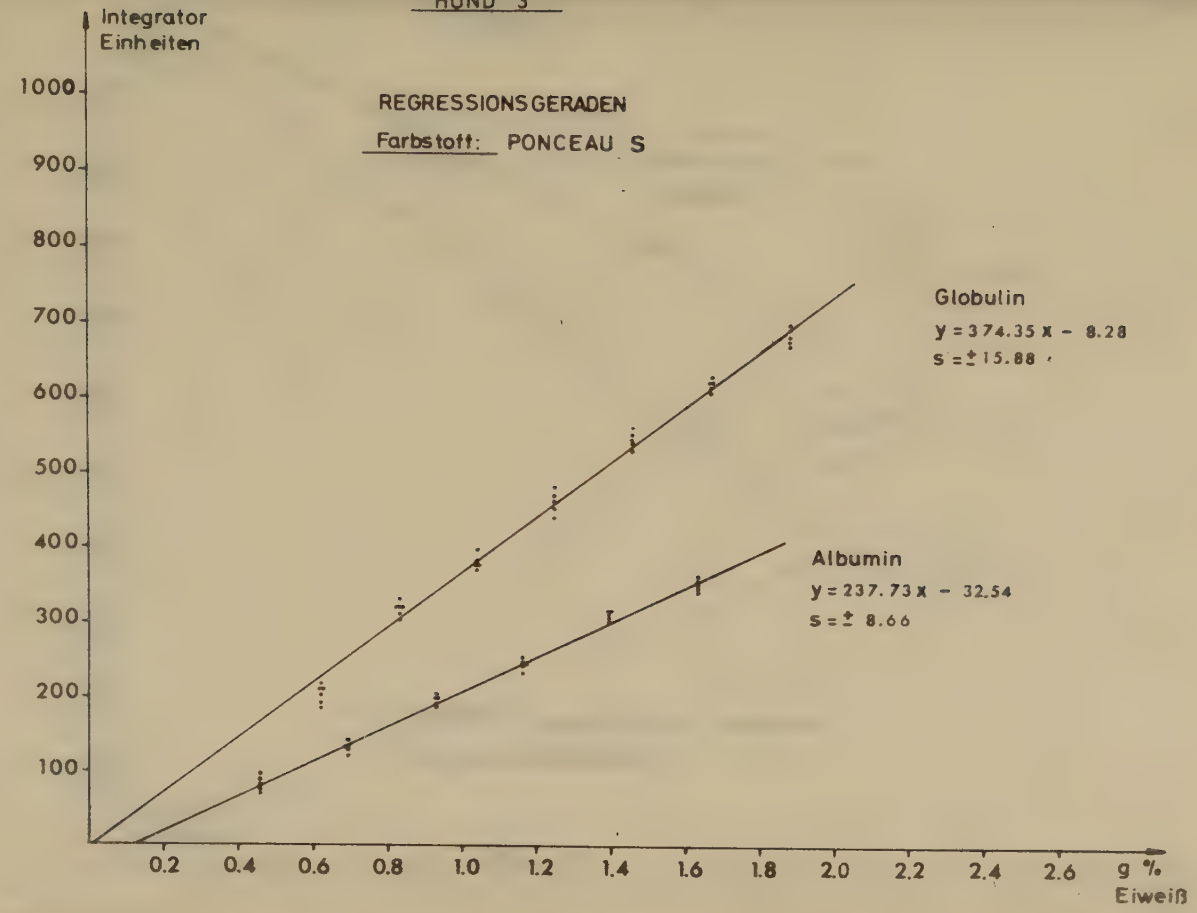

HUND 3
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PONCEAU S
Globulin
y = 374.35 x - 8.28
s = ± 15.88
Albumin
y = 237.73 x - 32.54
s = ± 8.66
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g % Eiweiß

Abb. 9

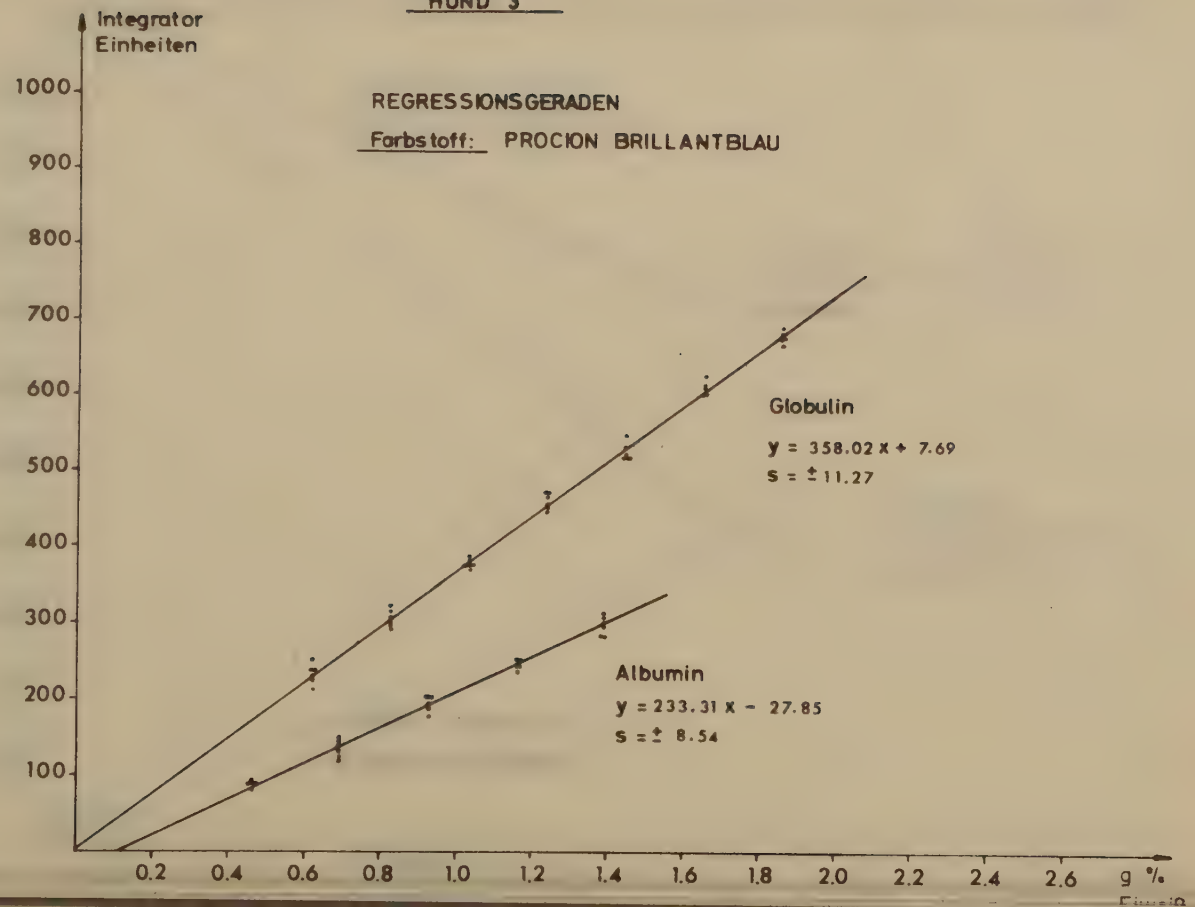

HUND 3
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PROCION BRILLANTBLAU
Globulin
y = 358.02 x + 7.69
s = ± 11.27
Albumin
y = 233.31 x - 27.85
s = ± 8.54
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %

Abb. 10

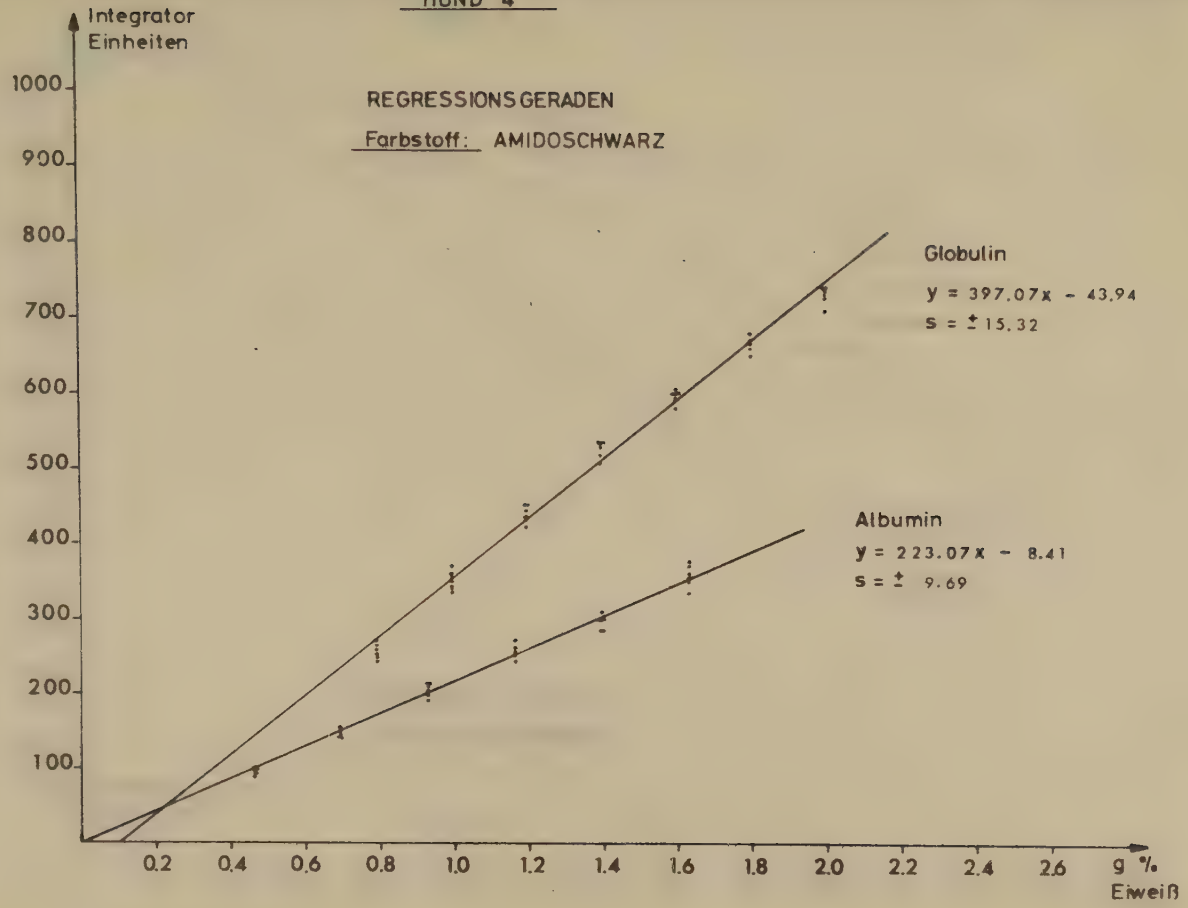

HUND 4
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: AMIDOSCHWARZ
Globulin
y = 397.07x - 43.94
s = ± 15.32
Albumin
y = 223.07x - 8.41
s = ± 9.69
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 11

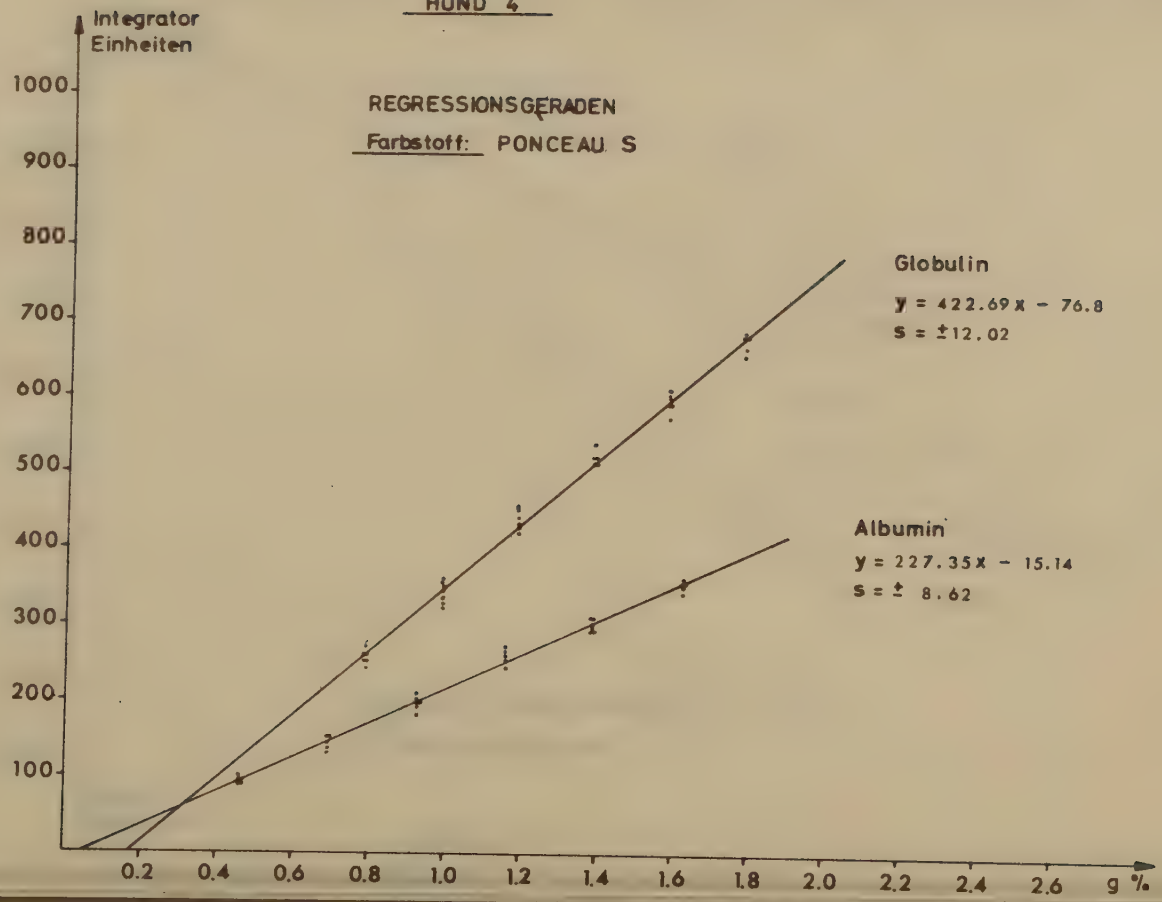

HUND 4
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PONCEAU S
Globulin
y = 422.69x - 76.8
s = ±12.02
Albumin
y = 227.35x - 15.14
s = ± 8.62
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %

Abb. 12

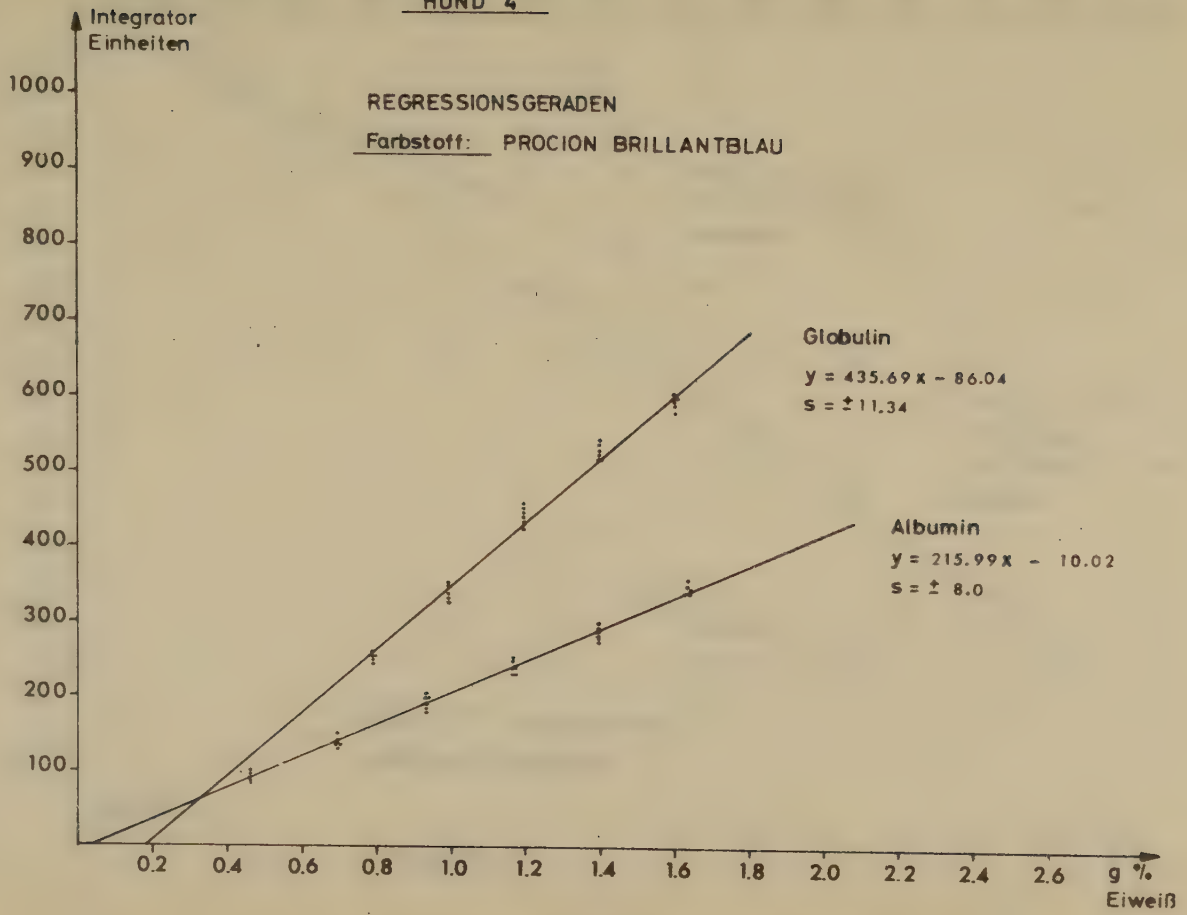

HUND 4
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PROCION BRILLANTBLAU
Globulin
y = 435.69 x - 86.04
s = ± 11.34
Albumin
y = 215.99 x - 10.02
s = ± 8.0
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 13

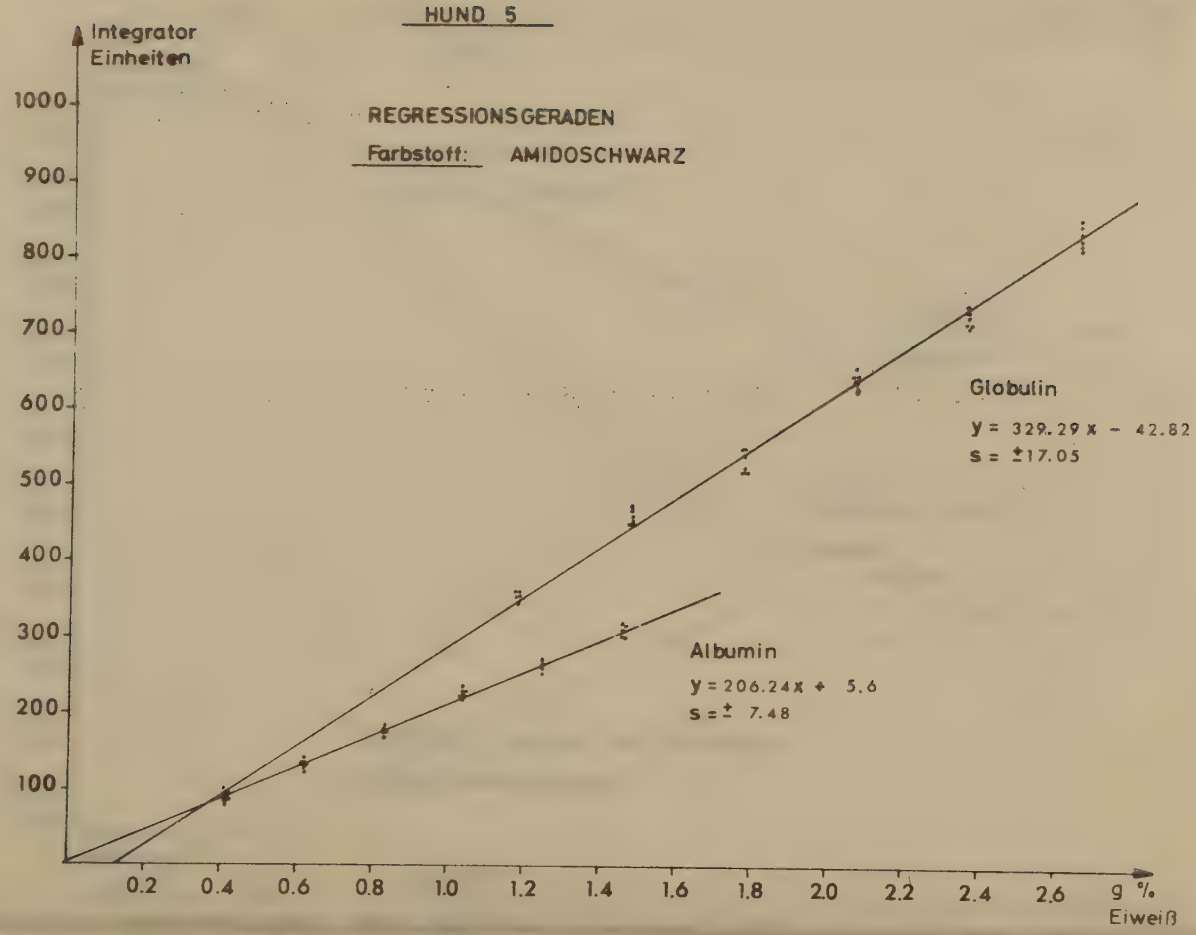

HUND 5
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: AMIDOSCHWARZ
Globulin
y = 329.29 x - 42.82
s = ±17.05
Albumin
y = 206.24x + 5.6
s = ± 7.48
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 14

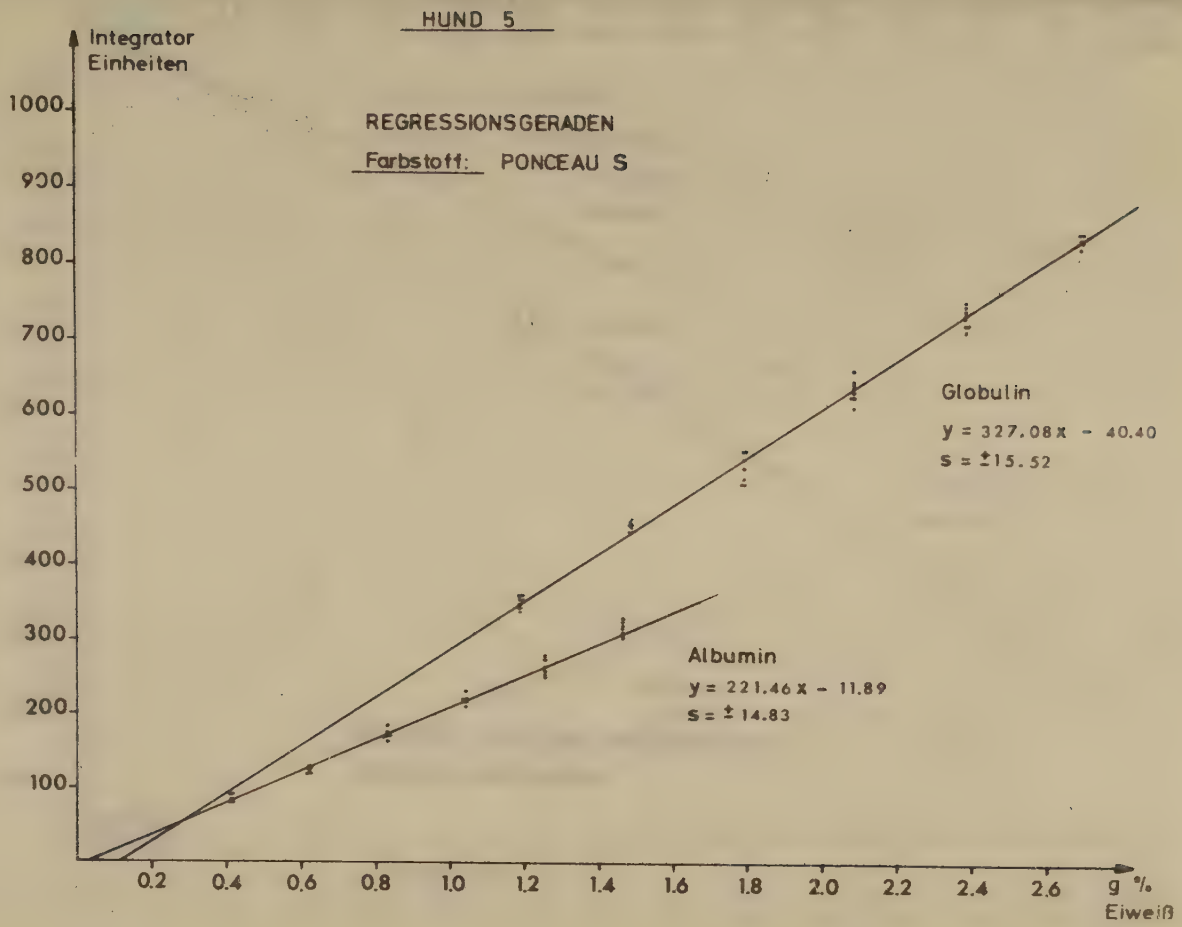

HUND 5
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PONCEAU S
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
Globulin
y = 327.08x - 40.40
s = ±15.52
Albumin
y = 221.46x - 11.89
s = ± 14.83
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 15

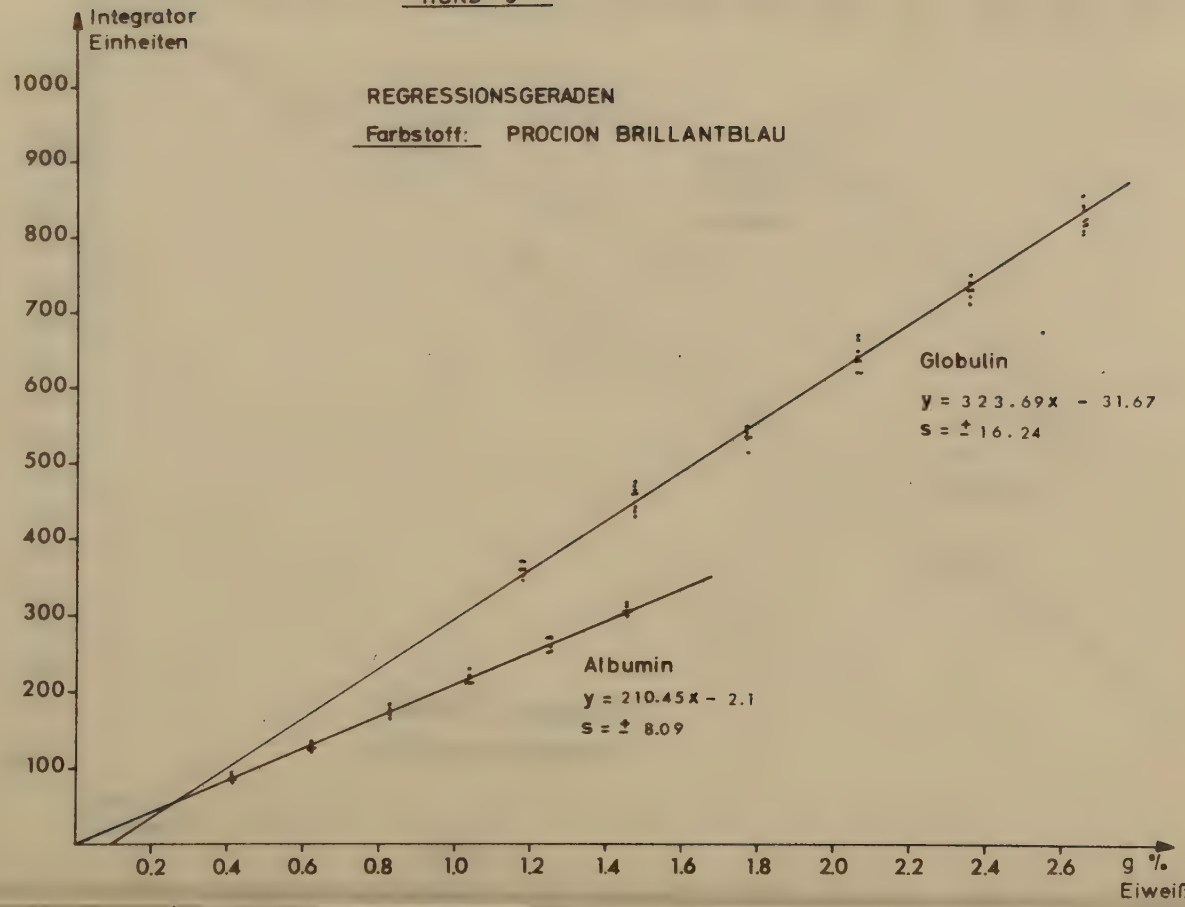

HUND 5
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PROCION BRILLANTBLAU
Globulin
y = 323.69x - 31.67
s = ± 16.24
Albumin
y = 210.45x - 2.1
s = ± 8.09
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 16

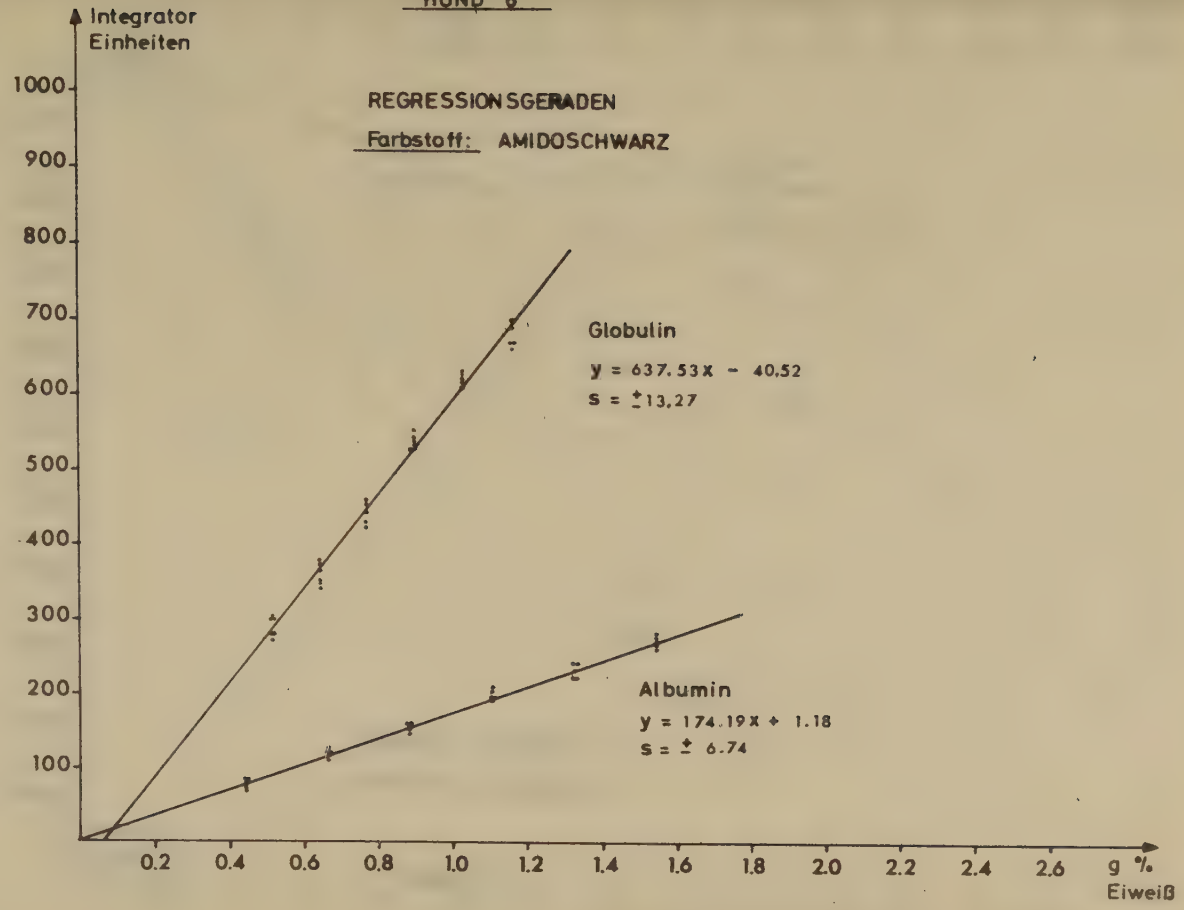

HUND 6
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: AMIDOSCHWARZ
Globulin
y = 637.53x - 40.52
s = ± 13.27
Albumin
y = 174.19x + 1.18
s = ± 6.74
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 17

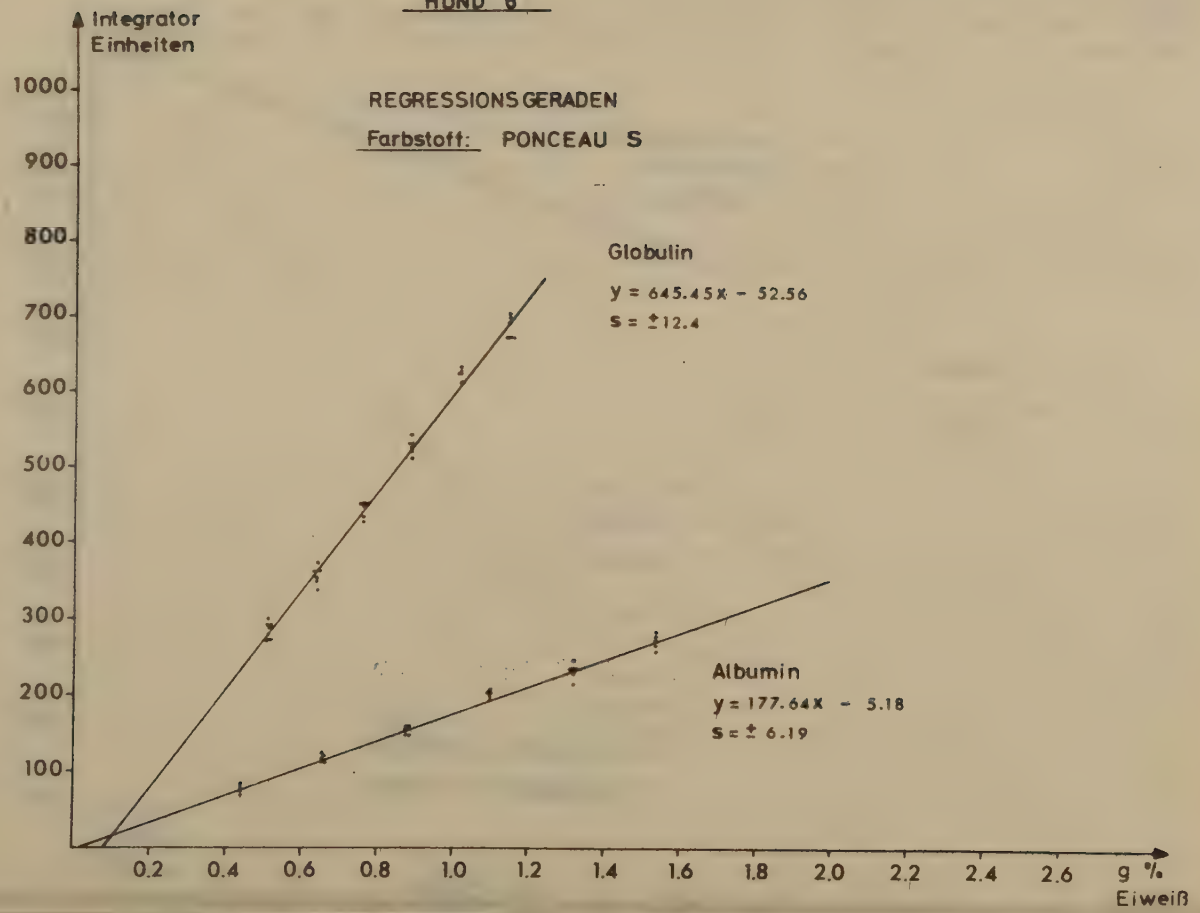

HUND 6
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PONCEAU S
Globulin
y = 645.45x - 52.56
s = ±12.4
Albumin
y = 177.64x - 5.18
s = ± 6.19
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 18

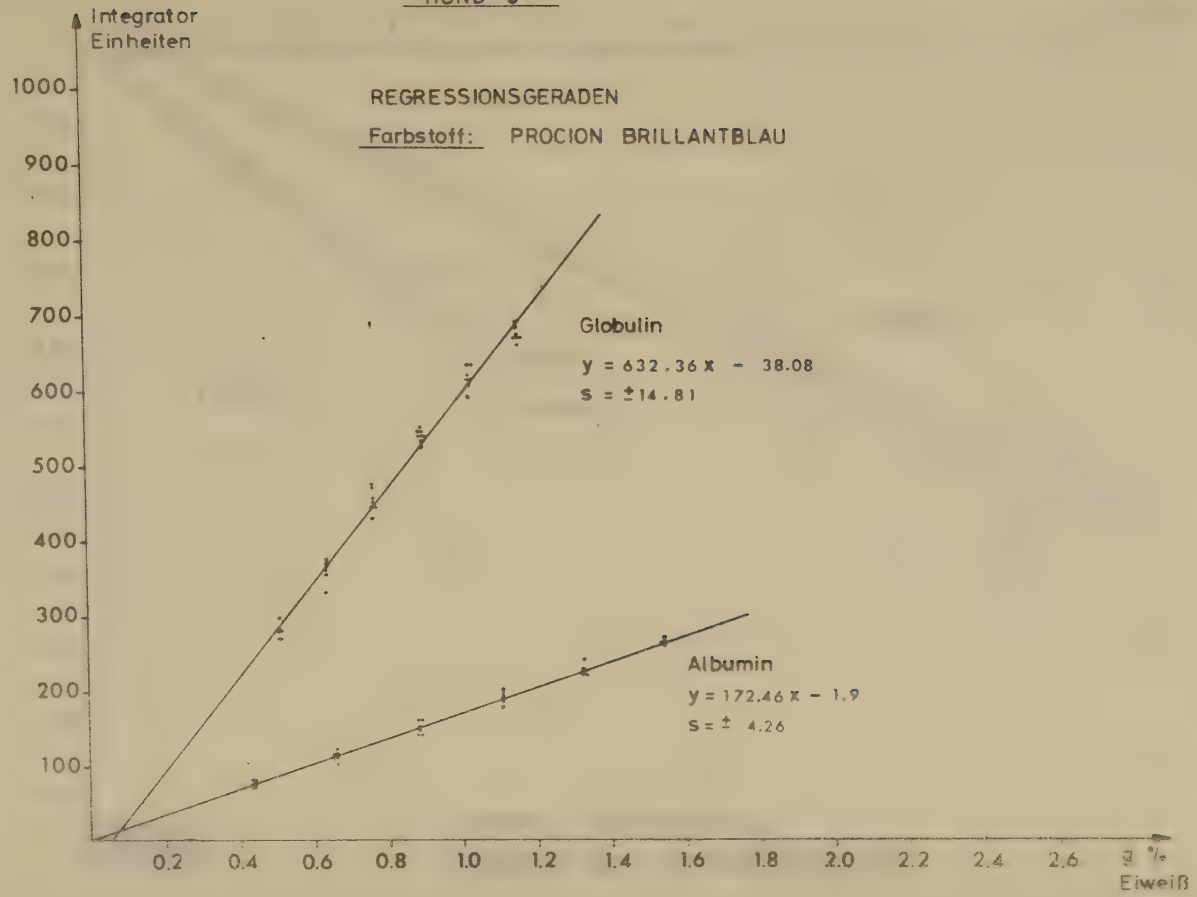

HUND 6
Integrator Einheiten
REGRESSIONSGERADEN
Farbstoff: PROCION BRILLANTBLAU
Globulin
y = 632.36 x - 38.08
s = ±14.81
Albumin
y = 172.46 x - 1.9
s = ± 4.26
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 19

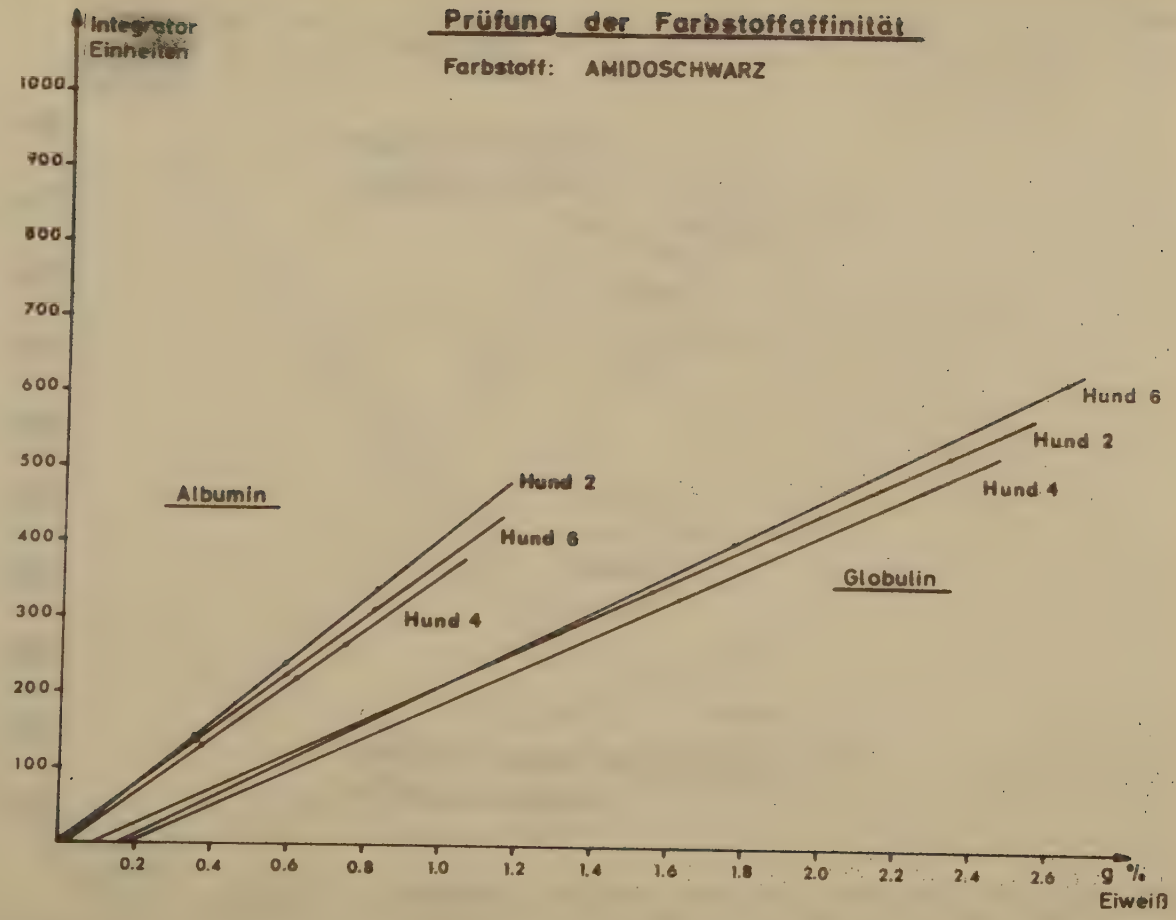

Prüfung der Farbstoffaffinität
Farbstoff: AMIDOSCHWARZ
Integrator Einheiten
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
Albumin
Hund 2
Hund 6
Hund 4
Globulin
Hund 6
Hund 2
Hund 4
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
g %
Eiweiß

Abb. 20

IX. Tabellen 1 - 4

Albumin-/Globulin-Bestimmung nach KACHANI/RODKEY

Hund	1		2		3		4		5		6	
	Alb. g%	Glob. g%	Alb. g%	Glob. g%	Alb. g%	Glob. g%	Alb. g%	Glob. g%	Alb. g%	Glob. g%	Alb. g%	Glob. g%
	5,66	2,37	6,09	2,52	5,83	2,06	5,91	1,95	5,23	2,90	7,46	1,37
	5,40	2,43	5,74	2,52	6,00	1,95	6,00	2,06	5,31	2,94	7,11	1,24
	5,57	2,48	5,91	2,39	5,40	2,01	5,83	1,88	5,40	2,99	7,54	1,28
	5,66	2,41	6,09	2,50	5,91	2,19	5,66	2,01	4,89	2,94	7,20	1,22
	5,74	2,46	5,91	2,35	5,83	2,17		2,06	5,31	2,97	7,37	1,28
	5,40	2,46			5,83	2,06			5,40	3,01		
$\bar{x}$	5,57	2,44	5,95	2,46	5,80	2,07	5,85	1,99	5,26	2,96	7,34	1,28

		S	v% bez.auf $\bar{x}$ = 5,93 g%
	Albumin	± 0,173 g%	2,91
Schätzwerte für den meth.Fehler			v% bez.auf $\bar{x}$ = 2,23 g%
	Globulin	± 0,0067 g%	3,02

Tabelle 1

Darstellung des Analysenmaterials für einen Hund (s.Ergebnisse S.24)

	A_{20}	A_{30}	A_{40}	A_{50}	A_{60}	A_{70}	A_{80}
Amidoschwarz	95	160	200	257	295	347	407
	85	150	200	240	290	345	415
490 nm	100	150	195	242	295	347	405
	85	150	205	255	295	345	400
	85	152	196	265	300	347	400
	90	145	205	252	295	360	400
Ponceau S	90	140	215	250	305	340	375
	85	152	185	245	295	350	400
480 nm	85	155	185	252	295	347	390
	95	150	200	245	310	345	390
	100	150	200	253	310	350	410
	95	148	193	249	300	346	393
Procion	85	150	185	250	290	360	390
Brillant Blau	90	160	210	255	305	345	400
	95	140	185	260	295	350	380
590 nm	85	145	195	240	280	340	400
	93	150	210	240	310	350	392
	100	150	190	260	210	352	395

Tabelle 2

Tabelle 3

Vergleich der mittleren Farbstoffaufnahme von Amidoschwarz, Ponceau S , Procion Brillant Blau durch Albumin bzw. Globulin

Prüfhypothese:

$\beta_{\text{Amidoschwarz}} = \beta_{\text{Ponceau S}} = \beta_{\text{Procion Brillant Blau}}$

Hund	Albumin	Globulin
1	nicht signifikant ($P > 0,05$)	nicht signifikant ($P > 0,05$)
2	nicht signifikant ($P > 0,05$)	signifikant ($P < 0,05$)
3	nicht signifikant ($P > 0,05$)	nicht signifikant ($P > 0,05$)
4	nicht signifikant ($P > 0,05$)	nicht signifikant ($P > 0,05$)
5	nicht signifikant ($P > 0,05$)	nicht signifikant ($P > 0,05$)
6	nicht signifikant ($P > 0,05$)	nicht signifikant ($P > 0,05$)

Tabelle 4

Vergleich der mit den Methoden
Freie Elektrophorese - Agarose-Gelelektrophorese
erhaltenen Werte

Hund	Ges.Eiw.	Träger-Elektrophorese		Freie Elektrophorese	
	g%	Albumin %	Globulin %	Albumin %	Globulin %
2	6,90	54,50 59,90 56,95 61,04 57,10	45,50 40,10 43,05 39,16 42,90	44,24 44,64 43,58 43,37 45,06	55,76 55,37 56,42 56,63 54,94
$\bar{x}$	%	57,90	42,10	44,18	55,82
	g%	3,99	2,91	3,05	3,85
4	6,38	58,17 63,11 61,52 63,31 63,78 63,41	41,83 36,89 38,48 36,69 36,22 36,59	49,10 48,78 49,83 49,71	50,90 51,22 50,17 50,29
$\bar{x}$	%	62,22	37,78	49,35	50,65
	g%	3,97	2,41	3,15	3,23
6	7,41	52,90 54,11 53,29 50,46 54,98	57,10 45,89 46,71 49,55 45,02	38,61 39,67 40,66	61,39 60,33 59,34
$\bar{x}$	%	53,15	46,85	39,65	60,35
	g%	3,94	3,47	2,94	4,47

Herrn Prof. Dr.phil. Dr.med.vet. Dr.med. G.Schützler möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die gern gewährten Ratschläge herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med.vet. M. Siegert, Akademischer Oberrat am Institut für Experimentelle Therapie und Funktionelle Pathologie, für die bei der Planung der Versuche und Abfassung der Arbeit geleistete Unterstützung.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts statte ich ebenfalls meinen Dank ab.

Herrn Dipl.-Kfm. Dr.rer.pol. H. Weiss danke ich für die Beratung in statistischen Fragen.

Am 28. April 1944 wurde ich als Tochter des Arztes Heinz Pulvermacher und seiner Ehefrau Ilse, geb. Petersen, in Seefeld/Tirol geboren.

Nach sechsjähriger Grundschulzeit in der 21.Grundschule Berlin-Charlottenburg besuchte ich die Wald-Schule OWZ/Berlin bis 1959. Anschließend wechselte ich in die Ecole d'Humanité, Schweiz, über, kehrte 1961 nach Berlin in die Waldschule zurück und legte 1963 die Reifeprüfung ab.
Danach studierte ich 9 Semester Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin und bestand am 18. März 1968 das Staatsexamen.
Die Praktikantenzeit absolvierte ich im Sommer 1968 an der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin.
Vom 1. Dezember 1968 bis zum 31. Dezember 1969 war ich als wissenschaftliche Hilfsassistentin am Institut für Experimentelle Therapie und Funktionelle Pathologie der Freien Universität Berlin tätig.